EXPERIENTIA

ARTHURO STOLL SEPTUAGENARIO

EST EXPERIENTIA SCIENTIA PARACELSUS

REVUE MENSUELLE DES SCIENCES PURES ET APPLIQUÉES
MONATSSCHRIFT FÜR DAS GESAMTE GEBIET DER NATURWISSENSCHAFT
RIVISTA MENSILE DI SCIENZE PURE E APPLICATE
MONTHLY JOURNAL OF PURE AND APPLIED SCIENCE

Editores:

P. HUBER · R. MATTHEY · A. v. MURALT · L. RUZICKA
Basel Lausanne Bern Zürich

Redactor: H. MISLIN, Basel-Mainz

BIRKHÄUSER VERLAG BASEL

SUISSE – SCHWEIZ – SVIZZERA – SWITZERLAND

SOMMAIRE - INHALT - SOMMARIO - CONTENTS

A. v. MURALT: Zum 8. Januar 1957 1

HUGO THEORELL: The Nature and Mode of Action of Oxidation Enzymes 2

H. BLASCHKO: Metabolism and Storage of Biogenic Amines . . 9

G. HESSE, B. BANERJEE und H. SCHILDKNECHT: Die Reizbewegungen der Mimosoideen und ihre Hormone 13

Brèves communications - Kurze Mitteilungen - Brevi comunicazioni - Brief Reports

N. P. BUU-HOÏ, N. D. XUONG et A. BEAUVILLAIN: Activité inhibitrice de certains α,β,β-triaryléthylènes vis-à-vis des sécrétions anté-hypophysaires 20

R. RENDI: Kolorimetrische Bestimmung des Arginins mit Diazetylmonoxim 21

A. FREY-WYSSLING, W. EPPRECHT und G. KESSLER: Zur Charakterisierung der Siebröhren-Kallose 22

R. LINDER et J. BRUN: L'incompatibilité dans *Oenothera Serrulata* Nutt. 23

MARIA SZÉKELY: Die Bedeutung der Mitochondrienstruktur für die Zitronensäuresynthese. 24

O. KUHN und W. WEBER: Mitosenverteilung in der larvalen Rumpfepidermis von *Salamandra maculosa* Laur. 25

Bo LINDELL and J. ZAJICEK: The Effect of Whole Body Röntgen Irradiation on the Megakaryocytic System in Rat Femur 27

M. NAKAMURA: Amebacidal Action of Cycloserine. 29

F. ANDERS: Untersuchungen über die Bildung der Reblaus-Blattgalle. 29

R. RICHTERICH-VAN BAERLE and L. GOLDSTEIN: Renal Ammonia Production as a Model for the Study of Enzyme Adaptation in Mammals. 30

A. B. ROY: The Kinetics of Sulphatase A 32

T. SAKAKI, A. KNOBLOCH et R. VENDRELY: Fractionnement par ultracentrifugation d'une nucléoprotéine de thymus de veau présentant une résistance marquée à la déprotéinisation 35

P. E. PILET: Variations de l'activité des auxines-oxydases dans les racines du *Lens* 35

E. ANTONINI, C. DE MARCO, S. CRIFÒ: Enzymatic Activities in the Perilymph Phosphoexoseisomerase and Lacticdehydrogenase 37

J. S. COLTER, R. A. BROWN, and D. KRIICHEVSKY: Physical Properties of Deoxyribonucleic Acid Isolated from Ehrlich Ascites Tumor Cells by Various Methods. 38

H. A. NIEPER und H. DRUCKREY: Fehlen einer karzinogenen Wirkung von Janusgrün an Ratten 40

C. BAZZICALUPO e A. PORTELLA: Su un criterio di valutazione dell'attività di un farmaco antitubercolare nella cavia infettata con carica massiva 40

O. PINOTTI e F. BRUNO: Ricerche fisiologiche sulla distribuzione periferica del nervo depressore aortico destro nel cane 42

G. CERIOTTI: An Adaptor for the Beckman Spectrophotometer for the Reading of Chromatograms and Electropherograms (Pro Laboratorio) 44

W. HÜLSEN: Beschreibung eines Gewebeschneiders zur Herstellung überlebender Gewebescheiben (Pro Laboratorio) . . 46

A. CRESSERI and A. SPELTA: A New Method for Visualizing and Recording Photographically Biautograms (Pro Experimentis) 47

Informations - Informationen - Informazioni - Notes

C. C. LINDEGREN and E. E. SHULT: The Interpretation of Genetical Data (Cogitationes). 48

A. PUNT and P. J. VAN NIEUWENHOVEN: The Use of Radioactive Bands in Tracing Hibernating Bats (Studiorum Progressus) 51

3ème Journée Suisse de Microscopie Electronique et 9ème Séance annuelle du Comité Suisse d'Optique (Comptes rendus des communications) 54

Congressus 56

Corrigenda 56

Elektronenmikroskope
Elektronendiffraktographen
Hochspannungsoszillographen

Trüb, Täuber · Zürich

Verzeichnis der Inserenten – Liste des annonceurs – List of Advertisers – Experientia XIII/1

Birkhäuser Verlag, Basel und Stuttgart
Ciba AG., Basel
Ganz & Co., Zürich
Kern & Co. AG., Aarau
Lonza AG., Basel
Sandoz A. G., Basel
Trüb, Täuber & Co., Zürich
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH., Stuttgart

Die EXPERIENTIA kann in folgenden Ländern durch die Post abonniert werden:
Des abonnements pour EXPERIENTIA peuvent être commandés près des bureaux de poste des pays suivants:

Italien	Belgien, Luxemburg	Dänemark	Schweden	Portugal
Deutschland	Holland	Norwegen	Finnland	Marokko

L'EXPERIENTIA paraît le 15 de chaque mois. Vente et abonnement dans toutes les librairies suisses et étrangères, ou directement chez l'éditeur. Abonnement pour un an Fr. 44.– pour la Suisse; pour l'étranger Fr. 56.–. Ces prix s'entendent en francs suisses.

Die EXPERIENTIA erscheint am 15. jedes Monats und kann im In- und Ausland durch jede Buchhandlung oder direkt vom Verlag bezogen werden. Der Abonnementspreis beträgt in der Schweiz Fr. 44.–, im Ausland sFr. 56.–.

Insertionspreise: $^1/_1$ Seite Fr. 220.–, ½ Seite Fr. 132.–, ¼ Seite Fr. 77.–. Inseratenannahme durch den Verlag.

EXPERIENTIA esce al 15 di ognis mese e può esser richiesta ad ogni libreria svizzera o estera, o anche direttamente alla casa editrice. L'abbonamento annuo è di fr. 44.– per la Svizzera; all'estero sfr. 56.– I prezzi vanno intesi in valuta svizzera.

EXPERIENTIA is published on the 15th of every month and can be obtained in any country through the booksellers or from the publishers. The price by annual subscription by inland mail is fr. 44.–; other countries sfr. 56.–. Prices in Swiss currency.

Prices for advertising: $^1/_1$ page fr. 220.–, ½ page fr. 132.–, ¼ page fr. 77.–. Advertisements should be sent to the publishers.

Copyright 1957 by Birkhäuser Verlag, Basel 10 (Schweiz), Elisabethenstrasse 19, Telephon (061) 235820; Telegrammadresse: Edita Basel

Printed in Switzerland by Birkhäuser AG., Basel

64-06681

Q1
A1E9
v. 13

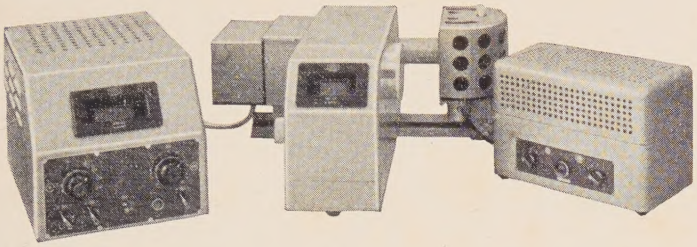
Das neue

ZEISS

Quarz-Spektralphotometer

PMQ II

erfüllt Ihre Wünsche!



Bitte verlangen Sie den ausführlichen Prospekt Nr. 05–657/E

Zuverlässige Beratung und Service durch eigenes Fachpersonal

CARL ZEISS

Generalvertretung für die Schweiz:

Beachten Sie die Vorteile:

- **Direktanzeige** des Meßwertes (ohne Einbuße an Meßgenauigkeit), dadurch Übersicht über das Absorptionsspektrum und Zeitgewinn.
- **Vollständiger Netzbetrieb.** Keine Akkumulatorwartung; jederzeit betriebsbereit.
- **Impulslicht – Wechselstromverfahren.** Dunkelstromeinstellung fällt weg und ebenso der feuchtigkeitsempfindliche Gleichstromverstärker (keine Trocknungspatronen mehr). Meßbereich: 200 bis 1000 mμ, nachträgliche Erweiterung bis 2500 mμ möglich.
- **Höchste Empfindlichkeit** durch Sekundärelektronen-Vervielfacher 1 P28.
- **Einfach-Monochromator** mit Quarz- oder Glasoptik oder **Doppel-Monochromator** mit auswechselbarer Quarz- und Glasoptik nach Wunsch.
- **Mikroküvetten** in Vorbereitung, welche ohne Beschneidung des Spaltbildes verwendet werden können, d.h. kein zusätzlicher Lichtverlust.

GANZ & CO

BAHNHOFSTR. 40
TEL. (051) 23 97 73

Zürich

LONZA

Calcium-Carbid

Metall-Legierungen: Ferrosilicium. Ferrosilicium-Aluminium (Alsimin), Ferrosilicium-Mangan.

Silicium-Metall (Reinsilicium)

Silicium-Carbid für schleif- und feuerfeste Zwecke sowie «Lonsicar» als Betonhartstoff. **Graphit.**

Stickstoff- und Komplex-Dünger: Kalksalpeter, Ammonsalpeter, Ammonsulfat, Kalkstickstoff, Nitrophosphat, Nitrophosphatkali, Volldünger, Composto Lonza.

Kunststoffe: Polyvinylchlorid, Polyvinylacetat, Mischpolymerisate, Polyvinylalkohol.

Weitere chemische Produkte

Acetaldehyd
Acetessiganilid
Acetessigäthylester
Acetessigmethylester
Aethylacetat
Ammoniak
Ammonnitrat
Anilin
Butylalkohol
Crotonaldehyd
Dicyandiamid
Essigsäure
Essigsäureanhydrid
Formaldehyd
Harnstoff
Methylacetat
Methylalkohol
Natriumacetat
Natriumnitrat
Natriumnitrit
Nitriersäure
Nitrobenzol
Paraldehyd
Salpetersäure
Speziallösungsmittel
Vinylacetat monomer

ELEKTRIZITÄTS-
WERKE
UND
CHEMISCHE
FABRIKEN
A.G.
BASEL

EXPERIENTIA SUPPLEMENTA

Experientia Supplementum I:
Symposium Basel, 1.–4. April 1952

Gegenwartsprobleme der Ernährungsforschung
Present Problems in Nutrition Research
Les problèmes actuels de la nutrition

Unter dem Patronat der Internationalen Union der Ernährungswissenschaften – Under the auspices of the International Union of Nutrition Sciences – Sous le patronage de l'Union internationale des sciences de la nutrition. Herausgeber: F. Verzár. Ganzleinenband, 312 Seiten, Fr./DM 32.– (1953).

Experientia Supplementum II:
Zürich, 21.–27. Juli 1955

XIVe Congrès international de chimie pure et appliquée
XIV. Internationaler Kongress für reine und angewandte Chemie
XIVth International Congress of Pure and Applied Chemistry

5 Conférences principales et 9 Conférences de sections – 5 Hauptvorträge und 9 Sektionsvorträge – 5 Main Congress Lectures and 9 Lectures in the Sections. Ganzleinenband, 282 Seiten, Fr./DM 32.– (1955).
Autoren: V. du Vigneaud – C. Dufraisse – N. A. Nesmeyanow – C. K. Ingold – K. Alder – D. H. R. Barton – S. Winstein – H. Erdtman – C. Fromageot – P. Pratesi – R. B. Woodward – L. G. S. Brooker – T. R. Seshadri – K. Ziegler.

Experientia Supplementum III:
Basel, 29. Mai bis 5. Juni 1954

Acta XI Congressus Internationalis Ornithologici

Im Auftrage des Präsidenten Sir Landsborough Thomson herausgegeben von Adolf Portmann und Ernst Sutter. Mit 186 Abbildungen und 14 Tafeln im Kupfertiefdruck. Ganzleinenband, 680 Seiten, Fr./DM 36.40 (1955).

NEUERSCHEINUNGEN

Experientia Supplementum IV:
Symposium Basel, 4.–7. April 1956

Experimentelle Alternsforschung
Experimental Research on Ageing

Herausgeber: F. Verzár – Inhalt: Die am Symposium gehaltenen Referate. Ganzleinenband, 292 Seiten, Fr./DM 34.– (1956).
Autoren: L. Brull und C. Keil – R. E. Tunbridge – D. A. Hall – I. Banga, J. Baló und D. Szabó – F. Verzár – N. R. Joseph und F. Bourlière – J. F. Danielli – G. H. Bourne – L. Haranghy, P. Rács, E. Hársfalvy und F. Király – F. H. Schulz – P. J. Thung – F. Hügin und F. Verzár – V. Korenchevsky – R. B. Fisher – O. Olbrich und E. Woodford-Williams – J. A. Huet – G. DiMacco – T. Geill – W. J. E. Jessop – H. Baur – J. Nöcker – G. Schettler – L. v. d. Horst – J. A. Schneider – W. Schulze – V. Freydberg-Lucas und F. Verzár – J. Rechenberger – E. Greppi – G. Scardigli und G. Guidi – M. Bürger – P. Divry – E. R. F. W. Crossman und J. Szafran – A. T. Welford – R. Brückner, O. Gsell, F. Hügin, E. Batschelet und F. Verzár – K. Fleischer – H. Ludwig – O. Mühlbock – F. M. Antonini.

Experientia Supplementum V:
Lissabon, 8.–16. September 1956

XVe Congrès international de chimie pure et appliquée
XV. Internationaler Kongress für reine und angewandte Chemie
XVth International Congress of Pure and Applied Chemistry

6 Conférences principales et 8 Conférences de sections – 6 Hauptvorträge und 8 Sektionsvorträge – 6 Main Congress Lectures and 8 Lectures in the Sections. Ganzleinenband, 240 Seiten, Fr./DM 32.– (1956).
Autoren: A. Tiselius – A. J. P. Martin – I. M. Kolthoff – F. Burriel Marti – F. Feigl – G. Charlot – K. Cruse – G. Duyckaerts – J. Debiesse – G. Schwarzenbach – G. Wernimont – M. K. Zacherl – H. de Carvalho – R. J. Forbes.

Zu beziehen durch die Buchhandlungen

BIRKHÄUSER VERLAG · BASEL / STUTTGART

EXPERIENTIA

Z U M 8. J A N U A R

Lieber Freund Stoll!

Alle Ihre vielen Freunde, die Wissenschaftler, die Künstler, die Mitarbeiter und alle diejenigen, die mit Ihnen in Berührung kommen durften, denken heute an Sie! Wir stellen uns vor, wie Sie etwas geniert Ihre Augenbrauen heben und begleitet von einer leicht abwehrenden Handbewegung mit der uns allen so vertrauten und liebgewordenen Stimme sagen: «Aber nein!»
Lassen Sie uns gewähren, denn Dankbarkeit drängt uns dazu, Ihnen am heutigen Tag zu gratulieren. Wir wissen schon, daß Sie keiner Aufzählung Ihrer großen Verdienste und keiner Dankesbezeugungen für den Berg an Arbeit bedürfen, den Sie der schweizerischen Wirtschaft und Wissenschaft in Ihrem reichen Leben geschenkt haben, denn Sie führen, irgendwo in einer Westentasche versenkt, den Stein der Weisen mit sich herum: Sie ruhen in sich selbst! Und davon geht die milde Kraft aus, die Ihnen so eigentümlich ist, der Sie die Bewahrung der Einfachheit des Herzens verdanken und die Begegnung mit Ihnen zum Erlebnis der Berührung mit einem freien Menschen werden läßt. Auf unsere großen Schweizer sind wir gerne stolz, aber nur in historischer und nie in zeitgenössischer Gestalt. Bei uns allen, Ihren vielen Freunden in der Schweiz und in der ganzen Welt, leuchtet aber insgeheim das Auge auf, wenn der Name Arthur Stoll fällt – und damit ist alles gesagt. Ad multos annos!

Alex v. Muralt

EXPERIENTIA

Vol. XIII - Fasc. 1 Pag. 1–56 15. I. 195

The Nature and Mode of Action of Oxidation Enzymes *

Nobel Lecture, December 12, 1955

By HUGO THEORELL, Stockholm[1]

Practically all chemical reactions in living nature are started and directed in their course by enzymes. This being the case, man has of course since immemorial time seen examples of what we now call enzymatic reactions, e.g. fermentation and decay. It would thus be possible to trace the history back to the ancient Greeks, or still further for that matter. But it would be rather pointless, since to observe a phenomenon is not the same as to explain it. It is more correct to say that our knowledge of enzymes is essentially a product of 20th century research.

Enzymes are a sort of *catalyzers*, and in this connection a reminder of the origin of the concept catalysis may be in place.

It was put forward by a school-fellow of mine from Linköping High School. I never had the honour of meeting him, as he was 124 years older than I. It was one of the founders of Karolinska Institutet and the Swedish Medical Society, JÖNS JACOB BERZELIUS, who in 1835 wrote in his year-book:

'This is a new force producing chemical activity and belonging as well to inorganic as organic nature, a force which is undoubtedly more widespread than we have hitherto imagined, and whose nature is still concealed from us. When I call it a new force I do not thereby mean to say that it is a capacity independent of the electrochemical relations of matter, on the contrary, I cannot but presume it to be a particular manifestation of these, but as long as we cannot understand their reciprocal connections it will facilitate our researches to regard it for the time being as an independent force, just as it will facilitate our discussion thereof if it be given a name of its own. I shall therefore use a derivation well-known in chemistry, call it the *catalytic force* of bodies decomposition through this force *catalysis*, just as with the term *analysis* we describe the separation of the constituent parts of bodies by means of ordinary chemical affinity. The catalytic force actually to consist therein that through their mere presence and not through their affinity bodies are able to arouse affinities which at this temperature are slumbering...'

Enzymes are the catalyzers of the biological world, and BERZELIUS' description of catalytic force is surprisingly farsighted – one is tempted to say propheti Especially is one struck by his expressly refusing t believe that other than chemical forces are here in play no, if one could once understand the mechanism would doubtless prove that the forces of ordinar chemistry would suffice to explain also these as ye mysterious reactions.

Almost a hundred years were to pass before it be came clear that BERZELIUS had been right. The yea 1926 was a memorable one. The German chemis RICHARD WILLSTÄTTER gave a lecture then in Deutsch Chemische Gesellschaft, in which he summarized th experiences gained in his attempts over many years t produce pure enzymes. Through various adsorptio methods he had removed more and more of the im purities in some enzymes. Especially he had worke with so called peroxidase, an enzyme of general occu rence in the vegetable kingdom. Finally, there was s little substance left that the ordinary analyse for e.g protein, sugar or iron the solutions gave negativ results. But the 'catalytic' enzyme effect was still there WILLSTÄTTER drew the conclusion that the enzyme could contain neither protein, carbohydrate nor iro and that they did not belong to any known class chemical substances at all, and he was even inclined t believe that the effects of the enzymes derived fro a new natural force, thus expressing view that 90 yea earlier BERZELIUS had dismissed as improbable.

That same year, through the irony of fate, the Amer can researcher J. B. SUMNER published a work in whic he claimed to have crystallized in pure form an enzym urease, from 'jack-beans'. It splits urea into carbo dioxide and ammonia. SUMNER had got his crysta in rather considerable quantities with the help of muc simpler methods than those applied by WILLSTÄTTE in purification experiments on other enzymes. SUM NER's crystals consisted of colourless protein. In th ensuing years J. H. NORTHROP and his collaborato crystallized out a further three enzyme preparation pepsin, trypsin and chymotrypsin, which are like ureas hydrolytic enzymes that split linkages by introducin water.

If these discoveries had been undisputed from th outset it would probably not have been 20 years befo SUMNER, together with NORTHROP and STANLEY, r

* Dedicated for the seventieth birthday of Prof. ARTHUR STOLL.

[1] The lecture was delivered in Swedish, but is here published in English translation.

ceived a Nobel prize. But it was not so easy to show that the beautiful protein crystals really were the enzymes themselves and not merely an inactive vehicle for the actual enzymes. Both SUMNER and NORTHROP adduced many probable proofs that what they had produced really were pure enzymes, but no absolutely conclusive experiment could be brought forward, and as a matter of fact this was at that time probably not possible, for the simple reason that their preparations appeared to consist of only colourless protein. At that time, and even to-day, for that matter, the methods of separation and analysis were scarcely sufficiently refined definitely to exclude the occurrence of small quantities of impurities in a protein preparation. From many quarters, accordingly, objections were raised to SUMNER's and NORTHROP's results, and for obvious reasons especially the WILLSTÄTTER school made itself heard in this connection.

The Yellow Enzyme

When in 1933 I went on a Rockefeller fellowship to OTTO WARBURG's institute in Berlin, WARBURG and CHRISTIAN had in the previous year produced a yellow-coloured preparation of an oxidation enzyme from yeast. It was obviously very impure in respect of the high-molecular constituent parts, which consisted chiefly of rubber-like polysaccharides. The yellow colour was of particular interest: it faded away on reduction and returned on oxidation with e.g. oxygen gas, so that it was evident that just the yellow pigment had to do with the actual enzymatic process of oxido-reduction. It was possible to separate the yellow pigment from the high-molecular carrier substance, whose nature was still unknown, for example by treatment with acid methyl alcohol, wherupon the enzyme effect disappeared. Through simultaneous works by WARBURG in Berlin, KUHN in Heidelberg and KARRER in Zürich the constitution of the yellow pigment (lactoflavin, later riboflavin; = vitamin B_2) was determined.

It was here for the first time possible to localize the enzymatic effect to a definite atomic constellation: hydrogen freed from the substrate (hexose monophosphate) is with the aid of a special enzyme system (TPN-Zwischenferment), whose nature was elucidated somewhat later, placed on the nitrogen atoms of the flavin (1) and (10), giving rise to the colourless leucoflavin. This is reoxidized by oxygen-gas, hydrogen peroxide being formed, and may afterwards be reduced again, and so forth. This cyclic process then continues until the entire amount of substrate has been deprived of two hydrogen atoms and has been transformed into phosphogluconic acid, and a corresponding amount of hydrogen peroxide has been formed. At the end of the process the yellow enzyme is still there in unchanged form, and has thus apparently, as BERZELIUS expressed himself, aroused a chemical affinity through its mere presence.

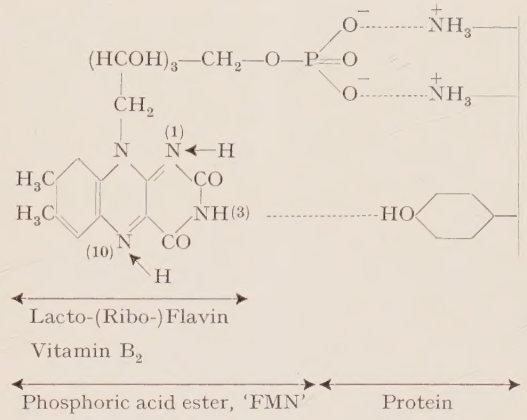


Fig. 1.

But there now remained some extremely important questions to elucidate: why was the flavin in free form completely inactive, but active when it was anchored to a high-molecular carrier? And what was this carrier? In order to find this out I decided to try to purify the yellow enzyme, using for the purpose electrophoretic methods worked out by myself. At this time TISELIUS had not yet worked out his technically more perfected electrophoretic methods, but my own proved in any case surprisingly useful.

The polysaccharides, which constituted 80–90% of the entire weight, were completely removed, together with some inactive colourless proteins. After fractional precipitations with ammonium sulphate I produced a crystalline preparation which on ultracentrifuging and electrophoresis appeared homogeneous. The enzyme was a protein with the molecular weight 75000 and strongly yellow-coloured by the flavin part. The result of the flavin analysis was 1 mol flavin per 1 mol protein. With dialysis against diluted hydrochloric acid at low temperature the yellow pigment was separated from the protein, which then became colourless. In the enzyme test the flavin part and the protein alone were inactive, but if the flavin part and the protein were mixed at approximately neutral reaction the enzyme effect returned, and the original effect came back when one mixed them in the molecular proportions 1:1. That in this connection a combination between the pigment and the protein came about was obvious, moreover, for other reasons: the green-yellow colour of the flavin part changed to pure yellow, and its strong yellow fluorescence disappeared with linking to the protein.

Developments in the flavin field were at this time (1934) to say the least, hectic. For a while RICHARD KUHN believed he was able to resynthesize the yellow ferment by bringing together lactoflavin and my colourless protein component; when his work was published, however, we were already aware in Berlin that this assumption was not correct. The point was that in my electrophoretic experiments lactoflavin behaved as a neutral body, while the pigment part separated from the yellow enzyme moved rapidly towards the anode

and was thus an acid. An analysis for phosphorus showed 1 P per mol flavin, and when after a time (1934) I succeeded in isolating the natural pigment component this proved to be a lactoflavin phosphoric acid ester, thus a kind of nucleotide, and it was obvious that the phosphoric acid served to link the pigment part to the protein.

I will now show some simple experiments with the yellow enzyme, its coloured part, which we now generally refer to as FMN (flavin mononucleotide), and the colourless enzyme protein.

Exp. 1. A lantern-slide apparatus is furnished with two cuvette-holders and mirrors, so that a correctly presented image of the cuvettes may be projected on a white screen. A slide with a solution of yellow enzyme and another with FMN of the same molar concentration are shown simultaneously. The ferment-solution is pure yellow, the FMN-solution green-yellow, owing to the fact that the light-absorption band in the blue of the free FMN is displaced somewhat in the long-wave direction on being linked with the protein component. A reducing agent ($Na_2S_2O_4$) is now added to one of the cuvettes, it is indifferent which. The colour disappears in consequence of the formation of leucoflavin. Oxygen-gas is bubbled through the solution: the colour comes back as soon as the excess of reducing agent has been consumed. The experiment demonstrates the reaction cycle of the yellow enzyme: reduction through hydrogen from the substrate side, reoxidation with oxygen-gas.

Exp. 2. A flask containing DMN-solution so diluted that its yellow colour is not discernible to the eye is placed on a lamp giving long-wave ultraviolet light. The solution gives a strong, yellow fluorescence which disappears on reduction and returns on bubbling with oxygen-gas.

Exp. 3. Two flasks are placed on the fluorescent lamp. One contains a diluted solution of the free protein in phosphate buffer (pH 7), the other phosphate buffer alone. An equal amount of FMN solution is dripped into each flask. In the flask with protein the fluorescence is at once extinguished, but in the flask with buffer-solution alone it remains. The experiment demonstrates the resynthesis of yellow enzyme, and since the fluorescence is extinguished by the protein one may draw the conclusion that some group in the protein is in this connection linked to the imino-group

(3)

of the flavin which according to KUHN must be free for the fluorescence to appear.

The significance of these investigations on the yellow enzyme may be summarized as follows:

(1) The reversible splitting of the yellow enzyme to apoenzyme + coenzyme in the simple molecular relation 1:1 proved that we had here to do with a pure enzyme; the experiments would have been incomprehensible if the enzyme itself had been only an impurity.

(2) This enzyme was thus demonstrably a protein. In the sequel all the enzymes, probably now over 100, which have been isolated, have proved to be proteins.

(3) The first coenzyme, FMN, was isolated and found to be a vitamin phosphoric acid ester. This has since proved to be something occurring widely in nature: the vitamines nicotinic acid amide, thiamine and pyridoxine form in an analogous way nucleotide-like coenzyme, which like the nucleinic acids themselves combines reversibly with proteins.

During the past 20 years a large number of flavoproteins with various enzyme effects have been produced. Instead of FMN many of them contain a dinucleotide, FAD, which consists of FMN + adenylic acid.

During the last few years technical advances have made it possible to attempt a chemical definition of the way in which the linkage between coenzyme and enzyme takes place. The now so-called 'old' yellow ferment has in this connection once more proved to be an excellent object. We constructed a very sensitive apparatus to record the time-interval in changes in the intensity of the fluorescence, and were thus able to follow the rapidity with which the fluorescence diminishes when FMN and protein are combined, or increases when they are split. Under suitable conditions the speed of combinations is very high.

Thanks to the great sensitivity of the fluorescence method my Norwegian collaborator AGNAR NYGAARD and myself were able to make accurate determinations of the speed-constant simply by working in extremely diluted solutions, where the speed of combination is low because an FMN-molecule so seldom happens to collide with a protein-molecule.

We now determined the reaction speeds under different conditions: we varied the degree of acidity, ionic milieu and temperature, and we treated the protein with a large number of different reagents which affect in a known way different groups in proteins. In this way we succeeded with a rather high degree of certainty in ascertaining that phosphoric acid in FMN is linked to primary amino-groups in the protein, and the imino group (3) in FMN to the phenolic hydroxyl group in a tyrosine residue, whereby the fluorescence is extinguished.

We still do not quite understand how through its linkage to the coenzyme the enzyme-protein 'activates' the latter to a rapid taking up and giving off of hydrogen. But something we do know. The so-called oxido-reduction potential of the enzyme is in any case of great importance, and it is determined by a simple relation to the dissociation constants for the oxidized and for the reduced coenzyme-enzyme complex. The dissociation constants are in their turn functions of the velocity constants for the combination between coen-

zyme and enzyme and for the reverse process, and these velocity constants we have been able to determine both in the yellow ferment and in a number of enzyme systems. Without going into any details I may mention that the linkage of coenzyme to enzyme was found to have surprisingly big effects upon the potential of the former. In a number of cases the effect is strongly dependent upon variations in the salt-content. Here we may suspect physiologically significant relations.

The Alcohol Dehydrogenases

I may now mention something concerning our work on the alcohol dehydrogenases, though I will here be relatively brief, as they are not well suited for experimental demonstrations in this lecture.

These enzyme systems, like the flavin proteids, consist of colourless proteins in reversible combination with a coenzyme, which in the present case is the diphosphopyridinenucleotide, earlier generally referred to as cozymase, now 'DPN', which has been elucidated in works by HANS VON EULER, KARL MYRBÄCK, RAGNAR NILSSON and others in Stockholm, and by OTTO WARBURG and WALTER CHRISTIAN in Berlin. It contains as active atomic group nicotinic acid amide, which analogously with the flavin in the yellow enzyme functions by absorbing hydrogen from one direction and giving it off in another. It contains, further, ribose, phosphoric acid and adenine.

Alcohol dehydrogenases occur in both the animal and the vegetable kingdom, e.g. in liver, in yeast and in e.g. peas. They are colourless proteins which together with DPN may either oxidize alcohol to aldehyde, as occurs chiefly in the liver, or conversely reduce aldehyde to alcohol, as occurs in yeast.

The yeast enzyme was crystallized by NEGELEIN and WULFF (1936) in WARBURG's institute, the liver enzyme (from horse liver) by BONNICHSEN and WASSÉN at our institute in Stockholm in 1948.

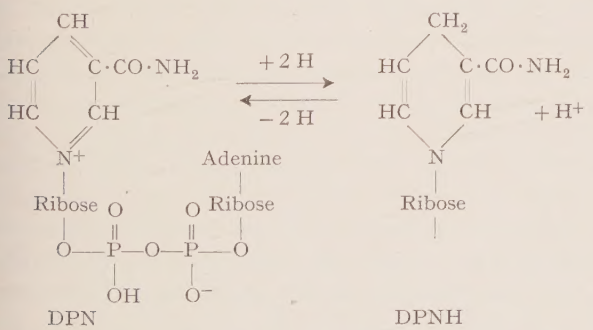


Fig. 2.

These two enzymes have come to play a certain general rôle in biochemistry on account of the fact that it has been possible to investigate their kinetics more accurately than is the case with other enzyme systems. The liver enzyme especially we have on repeated occasions studied with particular thoroughness since especially favourable experimental conditions here presented themselves. For all reactions with DPN-systems it is possible to follow the reaction $DPN^+ + 2\,H \rightleftarrows DPNH + H^+$ spectrophotometrically, since DPNH has an absorption-band in the more long-wave ultraviolet region, at 340 mμ, and thousands of such experiments have been performed all over the world. A couple of years ago, moreover, we began to apply our fluorescence method, which is based on the fact that DPNH but not DPN fluoresces, even if considerably more weakly than the flavins. As regards the liver enzyme there is a further effect, which proved extremely useful for certain spectrophotometrical determinations of reaction velocities; together with BONNICHSEN I found in 1950 that the 340 mμ band of the reduced coenzyme was displaced, on combination with liver alcohol dehydrogenase, to 325 mμ, and together with BRITTON CHANCE we were thus able with the help of his extremely refined rapid spectrophotometric methods to determine the velocity constant for this very rapid reaction.

I shall not go into further details, but simply point out that extremely complicated reactions result from the fact that we are here dealing with a three-body problem containing the enzyme protein, the coenzyme and the substrate, where, furthermore, both the coenzyme and the substrate occur in both oxidized and reduced forms.

A more or less complete system may be written thus: that only after 9 steps does the enzyme become free to begin a new cycle; the net result is that the alcohol has given 2 of its hydrogen atoms to the coenzyme. Even this simplified scheme means that one must determine 18 velocity constants, 2 for each part-reaction, which is of course a formidable task. We have succeeded, however, in determining some of them as regards the yeast enzyme.

The kinetics of the liver enzyme is quite different from that of the yeast enzyme. Here almost literally, we have to do with a simpler reaction process which can be expressed with only 3 equations and 6 velocity constants.

We have here been able to determine all the six constants at different degrees of acidity and with different salt-content, so that the reaction velocities of this enzyme system are probably at present the best known of all (THEORELL, BONNICHSEN, CHANCE, NYGAARD).

The difference between the yeast and liver enzymes indicated here explains why the yeast enzyme produces alcohol from aldehyde while the liver enzyme afterwards does the contrary.

It is a curious whim of nature that the same coenzyme which in the yeast makes alcohol by attaching hydrogen to aldehyde also occurs in the liver to remove, on the advent of the alcohol, e.g. through the taking of

food, the same hydrogen again, so that the alcohol becomes aldehyde again, which is then oxidized further.

When we had studied the kinetics of the alcohol dehydrogenases it was a simple matter to use these to determine alcohol quantitatively, e.g. in blood samples. This so called 'ADH'-method is about as accurate as WIDMARK's method, only more sensitive and above all practically specific for ethyl alcohol. It is now legally introduced in forensic chemical practice in Sweden and in West Germany.

Hemin Proteids

Even before going to Berlin in 1933 I had become interested in a close relative of hemoglobin, the myochrome or, as it was afterwards called, the myoglobin, discovered spectroscopically by K. A. H. MÖRNER in 1897, and I had crystallized it in the pure form in 1932.

After my return home I set about purifying another hemin proteid, viz. cytochrome c, one of the 'histohematins' or 'myohematins' observed by the Irishman MACMUNN in his home-made spectroscope at the end of the 1880's. MACMUNN's 'hematins', after a period of obscure existence in brevier type in larger textbooks, had been brought out into the light again by DAVID KEILIN in Cambridge in 1925. In 1936 we had obtained the cytochrome approximately 80% pure, and in 1939 at all events very close to 100%.

It is a beautiful red, iron-porphyrin-containing protein which functions as a link in the chain of the cell-respiration enzymes, the iron atom now taking up and now giving off an electron, and the iron thus alternating valency between the 3-valent ferric and the 2-valent ferrous stages. It is a very pleasant substance to work with, not merely because it is lovely to look at, but also because it is uncommonly stable and durable. From 100 kg heart-meat of horse one can produce 3–4 grams of pure cytochrome c. The molecule weighs about 12000 and contains one mol iron porphyrin per mol.

Exp. 4. Two cuvettes each contain a solution of ferricytochrome c. The colour is blood-red. To the one are added some grains of sodium hydrosulphite: the colour is changed to violet-red (ferrocytochrome). Oxygen is now bubbled through the ferrocytochrome-solution: no visible change occurs. The ferrocytochrome can therefore not be oxidized by oxygen. A small amount of cytochrome oxidase is now added: the ferricytochrome colour returns.

From this experiment we can draw the conclusion that reduced cytochrome c cannot react with molecular oxygen. In a chain of oxidation enzymes it will thus not be able to get next to the oxygen. The incapacity of cytochrome to react with oxygen was a striking fact that required an explanation. Another peculiarity was the extremely firm linkage between the red hemin pigment and the protein part; in contradistinction to the majority of other hemin proteids, the pigment cannot be split off by the addition of acetone acidified with hydrochloric acid. Further, there was a displacement of the light-absorption bands which indicated that the two unsaturated vinyl groups in the hematin of the cytochrome occurring in ordinary protohemin were saturated. In 1938 we succeeded in showing that the porphyrin part of the cytochrome was linked to the protein by means of two sulphur bridges from cystein residues in the protein of the porphyrin in such a way that the vinyl groups were saturated and were converted to α-thioethyl groups. The firmness of the linkage and the displacement of the spectral bands were herewith explained. This was the first time that it had been possible to show the nature of chemical linkages between a 'prosthetic' group (in this case iron porphyrin) and the protein part in an enzyme. KARL GUSTAV PAUL has since found an elegant method whereby to split the sulphur bridges with silver salts, and he has with organic chemical methods conclusively confirmed the constitution in this respect.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

Val–Glu–Lys–Cy–Ala–Glu–Cy–His–Thr–Val–Glu–Lys

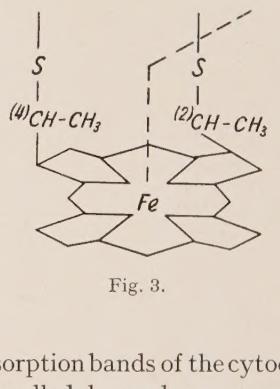


Fig. 3.

The light-absorption bands of the cytochrome showed that it is a so-called hemochromogen, which means that two as a rule nitrogen-containing groups are linked to the iron, in addition to the four pyrrol-nitrogen atoms in the porphyrin. From magnetic measurements that I made at LINUS PAULING's institute in Pasadena and from aminoacid analyses, titration curves and spectrophotometry together with Å. ÅKESON it emerged (1941) that the nitrogen containing, hemochromogen-forming groups in cytochrome c were histidine residues, or to be more specific, their imidazol groups.

Recently we have got a bit farther. TUPPY and BODO in Vienna began last year with SANGER's Method to elucidate the aminoacid sequence in the hemin containing peptide fragment that one obtains with the proteolytic breaking down of cytochrome c, and succeeded in determining the aminoacids nearest the hemin. The experiments were continued and supplemented by TUPPY, PALÉUS and EHRENBERG at our institute in Stockholm with the following result (Fig. 3).

The peptide chain 1–12 ('Val' = the aminoacid valine, 'Glu' = glutamine, 'Lys' = lysine and so forth) is by

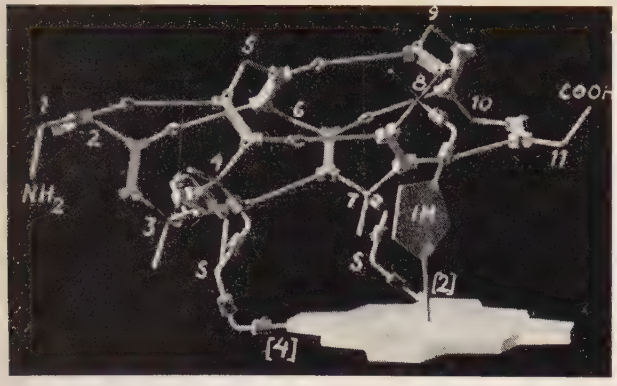


Fig. 4.

(Acta chem. Scand. *9*, 1193 [1955])

Steric model of the hemopeptide remaining after pepsin-digestion of cytochrome c, constructed of metal parts representing the atomic distances and valency-directions. In the Figure the peptide chain is disposed by means of 'hydrogen linkages' as a left-twisting α-spiral, seen at right angles to the longitudinal axis. Both the sulphur bridges (S) and the imidazole group (*IM*) of the histidine then fit their correct linkage-positions, and the peptide chain becomes parallel with the hemin disc (the light, polygonal metal plate at the bottom of the picture).

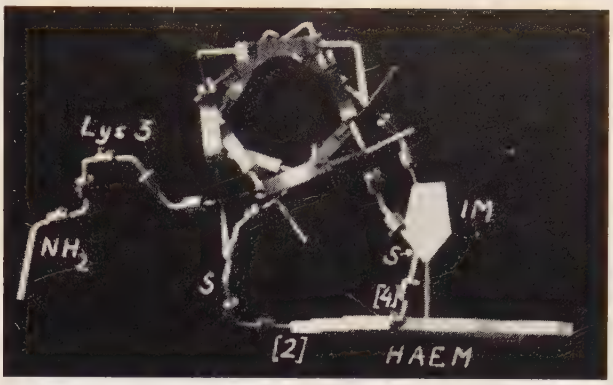


Fig. 5.

(Acta chem. Scand. *9*, 1193 [1955])

The model seen in the longitudinal direction of the α-spiral. For the sake of clarity the side chains have been fitted only to the amino acids Lys (3), Cy (4), Cy (7) and His (8).

means of two cysteine-S-bridges and a linkage histidine-Fe linked to the hemin.

When in 1954 LINUS PAULING delivered his Nobel lecture in Stockholm he showed a new kind of models for the study of the steric configuration of peptide chains, which as we know may form spirals or pleated sheets of various kinds. It struck me then that it would be extremely interesting to study the question as to which of these possibilities might be compatible with the sulphur bridges to the hemin part and with the linkage of nitrogencontaining groups to the iron. PAULING was kind enough to make me a present of his peptide-model pieces, which I shall show presently. This is thus the second time they figure in a Nobel lecture.

ANDERS EHRENBERG and I now made a hemin model on the same scale as the peptide pieces and constructed models of hemin peptides with every conceivable variant of hydrogen linkage. It proved that many variants could be definitely excluded on steric grounds, and others were improbable for other reasons. Of the original at least 20 alternatives finally only one remained—a left-twisting α-spiral with the cysteine residue no. 4 linked to the porphyrin side chain in 4-position, and cysteine no. 7 to the side chain in 2-position. The imidazole residue fitted exactly to linkage with the iron atom. The peptide spiral becomes parallel with the plane of the hemin disc.

I think it may be said that it was of considerable interest to have PAULING's and COREY's most important spiral confirmed with purely chemical methods, which in our case of course was possible thanks to the unique circumstance that we had a short peptide linked at no fewer than three places to a rigid structure, the hemin. After we had sent this work to the printer's there arrived from ARNDT and RILEY in England a roentgen-crystallographic confirmation that cytochrome c contains left-twisting α-spirals.

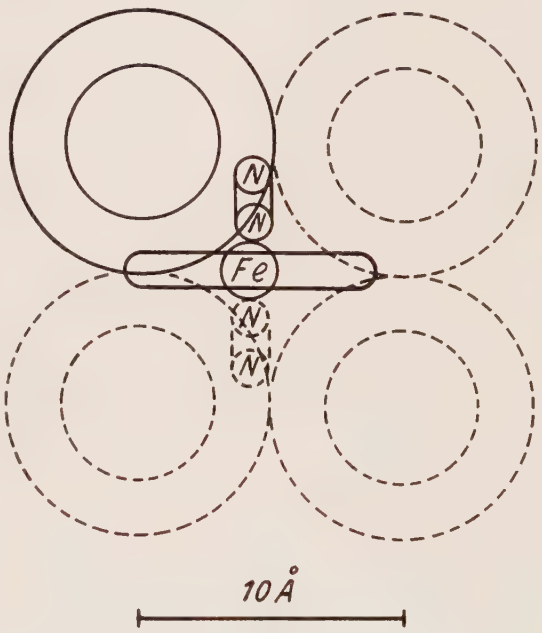


Fig. 6.

(Acta chem. Scand. *9*, 1193 [1955])

Hypothetical section through a cytochrome-c-molecule. Whole-drawn lines: the hemopeptide. Dashed lines: parts of the natural molecule split off with pepsin. The region between the outer and inner circles is taken up by the side chains of the amino acids. The four peptide chains surround the iron atom (Fe), making it inaccessible to oxygen-gas.

Through calculations on the basis of the known specific weight of the cytochrome we now consider it extremely probable that the hemin plate in cytochrome c is surrounded by peptide spirals on all sides in such a

way that the hemin iron is entirely screened off from contact with oxygen-gas; here is the explanation of our experiment in which we were unable to oxidize reduced cytochrome c with oxygen-gas. The oxygen simply cannot get at the iron atom. There is, on the other hand, a possibility for electrons to pass in and out in the iron atom via the imidazole groups.

One sixth of the entire steric structure of the cytochrome molecule is herewith elucidated, and we glimpse further possibilities of gradually elucidating the rest. It strikes us as interesting that even at this stage the special mode of reacting of the cytochrome is beginning to be understood from what we know of its chemical constitution.

Peroxidases and Catalases

These, according to what we know, are hemin proteids, thus close relatives of hemoglobin and cytochromes. The modes of action of the catalases and peroxides were studied as early as the beginning and middle of the 19th century respectively. It was almost inevitable that the first to produce hydrogen peroxide, the Frenchman Thénard, should also discover the catalase effect; as soon as hydrogen peroxide is brought into contact with the majority of native biological materials the hydrogen peroxide is broken down with development of gas to oxygen + water. That the catalases contain hemin as an active group was shown as probable by Zeile and Hellström at Hans von Euler's institute in 1930, and the first catalase, from cow's liver, was crystallized by Sumner and Dounce in 1937.

Exp. 5. To 3% H_2O_2 in phosphate buffer pH 7 is added 0·2 mg catalase. A vehement formation of gas is observed. When the bubbling has abated the contents are poured out and fresh H_2O_2 + buffer is added. The bubbling nevertheless continues in consequence of minimal amounts of remaining catalase.

The peroxidases are of general occurrence in the vegetable kingdom. When in 1941 we crystallized a peroxidase for the first time, from horse-radish, it proved, contrary to Willstätter's assumptions, to contain protein as well as carbohydrate and hemin, therefore iron. The reason why Willstätter was unable to show the presence of any of these compounds in his diluted solutions, which were nonetheless still active, was simply that Willstätter had happened upon a quite unusually strongly active enzyme. One thousandth of a milligram in one liter of solution still gives a distinct effect. The peroxidases do not break down hydrogen peroxide directly, but 'activate' it to oxidize quite a numbers hydroquinones, anilines or even nitrite.

Exp. 6. To H_2O_2 in acetate buffer, pH 4.6, is added a trace of peroxidase: no effect. Benzidine is now added: blue colouring.

Peroxidases occur here and there in animal material e.g. in leucocytes (verdoperoxidase, isolated in pure form by Kjell Agner 1941) and in milk (lactoperoxidase, isolated by myself and Åkeson a year or so later).

In the living cells both catalases and peroxidases function in the same way by using the hydrogen peroxide arising in connection with the reaction of oxygen with a number of autoxidable substances, such as flavins, ascorbic acid etc., to oxidize otherwise difficultly combustible substrates. Especially interesting is Agner's observation that the verdoperoxidase in the leucocytes+H_2O_2 can detoxify, for example tetanus and diphteria toxins, which would of course explain one of the main functions of the leucocytes.

Catalases and peroxidases both give, with H_2O_2, first greenish complex compounds and then reddish ones. The study of these has presented immensely intricate problems, where we have had to use combinations of spectrophotometric and now very refined magnetic methods to try to elucidate the mechanism. Our American colleague Britton Chance, who in 1946 to 1948 worked at the Nobel Institute, has successfully carried investigations still further in this field.

To conclude: what is the final goal of enzyme research?—The first stage is to investigate the entire steric constitution of all enzymes—a nice little job. So far we know the *most easily* accessible sixth part of the smallest enzyme molecule, cytochrome c.

In the second stage it is a matter of deciding how the enzymes are arranged in the cell-structures. This implies, as a matter of fact, the filling of the yawning gulf between biochemistry and morphology.

Zusammenfassung

Die Entwicklung unserer Kenntnisse über drei bedeutsame Fermentsysteme: das «alte gelbe Ferment», die Alkoholdehydrogenase und die Häminproteide, wird in ihren Hauptzügen verfolgt. Einige Vorlesungsexperimente werden beschrieben.

Metabolism and Storage of Biogenic Amines* **

By H. Blaschko [1], Oxford

One hundred years ago, on September 29th, 1856, Vulpian[2] communicated to the Paris Academie des Sciences his observations on the colour reactions of the adrenal medulla. Vulpian describes the characteristic reactions with iodine, with ferric chloride and with alkali. He concludes: «Il existe donc une matière spéciale, inconnue jusqu'ici, douée de propriétés chimiques remarquables, qui se trouve exclusivement dans la substance médullaire des capsules surrénales, et qui, par conséquent, constitue le *signe particulier* de ces organes.

Mais cette matière, qui se montre ainsi dans la substance médullaire, est-elle destinée à s'y détruire sur place, ou bien pénètre-t-elle dans le sang, pour être entraînée dans le torrent circulatoire? Je suis très-disposé à admettre la seconde supposition...» The reason why he believes this second alternative to be true, is because the characteristic colour reaction can also be seen in the suprarenal venous blood. «Ainsi serait prouvée, pour la première fois et d'une façon décisive, l'hypothèse qui regarde les capsules surrénales comme des glandes dites sanguines, c'est-à-dire versant directement dans le sang leur produit de sécrétion.

Quelle est l'importance de cette sécrétion? J'avoue que je n'ai encore pu me former aucune idée sur les usages possibles de cette matière. Je ne hasarderai par conséquent aucune hypothèse.»

In retrospect, it seems remarkable that Vulpian's prophetic conclusions were not immediately followed up. Forty years elapsed before the remarkable biological activitity of the adrenal medullary hormone was discovered. On the other hand, Vulpian's work is not forgotten, and the colour reaction with iodine is the basis of a useful modern method of determination of the catechol amines (v. Euler and Hamberg[3]). The product of the oxidation of adrenaline with iodate, the iodoadrenochrome of adrenaline, was obtained in crystalline form in 1937[4]. The reaction product of the oxydation by potassium bichromate, to which the chromaffine cell owes its name, has not yet been isolated. The chromaffine reaction was described by Henle[5] nine years after Vulpian's discovery.

Adrenaline is a typical representative of those compounds to which Guggenheim[6] has given the name 'biogenic amines'. This group includes substances which have high biological activity, and it is with these substances that this review is concerned. Three different groups of compounds can be distinguished:

(1) The catechol amines: adrenaline, noradrenaline and dopamine;

(2) histamine; and

(3) 5-hydroxytryptamine (HT) and related compounds.

These three groups of amines have much in common. They have high activity upon both muscles (plain and cardiac) and glands. They are all derived from the amino acids present in proteins. They are all stored in specific storage sites in cell granules, and they are all inactivated by enzymes in the tissues.

We have to remember that the biological significance of these substances is still imperfectly understood. Most is known about adrenaline and noradrenaline, important as hormones and the latter also as mediator at adrenergic nerve endings. However, the function of the more recently discovered 'brain sympathin'[7], a mixture of adrenaline and noradrenaline, is still unknown. It is of interest that brain sympathin and brain HT[8] are present in the same sites, i. e., in the hypothalamus and brain stem. It is generally agreed that HT is a biogenic amine of great importance, but its normal function is still unknown. Histamine, although known for almost 50 years, is also still without a definitely assigned physiological role; as far as is known at present, its great importance lies in its 'nuisance value', the symptoms which it causes when it is released from cells into the tissue fluids under pathological conditions (see [9]).

In recent years, biochemical methods have added much to our knowledge of these compounds. It is these new findings and the new questions that they pose which will be discussed in the following.

A. *Formation of Amines in the Animal Organism*

The biogenic amines are derived from the dietary amino acids. The amines owe their origin to the pres-

* Dedicated for the seventieth birthday of Prof. Arthur Stoll.

** Lecture held at the Swiss Society of Physiology, Biochemistry and Pharmacology, Fribourg 1956.

[1] From the Department of Pharmacology, University of Oxford.

[2] D. Vulpian, C. r. Acad. Sci., Paris *43*, 663 (1856).

[3] U. S. v. Euler and U. Hamberg, Acta physiol. scand. *19*, 74 (1949).

[4] D. Richter and H. Blaschko, J. chem. Soc. *1937*, 601.

[5] J. Henle, Z. rationelle Med. 3. Reihe, *24*, 143 (1865).

[6] M. Guggenheim, *Die biogenen Amine* (Karger, Basel, 4. Aufl. 1951).

[7] M. Vogt, J. Physiol. *123*, 451 (1954).

[8] A. H. Amin, T. B. B. Crawford, and J. H. Gaddum, J. Physiol. *126*, 596 (1951).

[9] *Ciba Foundation Symposium on Histamine* (Churchill, London 1956).

ence of specific enzymes, the amino-acid decarboxylases which catalyse reactions of the general type:

$$\underset{\text{amino acid}}{R\cdot CH(NH_2)\cdot COOH} \longrightarrow \underset{\text{amine}}{R\cdot CH_2\cdot NH_2} + CO_2$$

Decarboxylation is the reaction in which biological activity arises; the amino acids are without the characteristic biological activity. It seems that the zwitter ions must first be converted to the base, before biological acitivity appears. However, decarboxylation is not the only step in the biosynthesis of the biogenic amines. The complexity of the biosynthetic pathway differs for each group of amines; it depends upon the number of differences between the starting material and the finished product. Formation is a one-step reaction for histamine; here the histidine decarboxylase is the only catalyst involved. The histidine decarboxylase, like all other amino-acid decarboxylases, contains pyridoxal-5-phosphate as its prosthetic group.

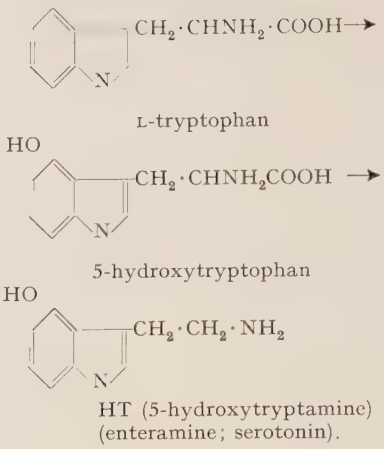
Histidine decarboxylase was discovered in bacteria, but it also occurs in mammalian tissues (Werle[10]; Waton[11]). The histidine decarboxylase activity of the tissues is low, and for this reason enzymic activity in tissue extracts is often difficult to demonstrate. This has led to the suggestion that in some species, including man, histamine is not formed, but taken up from the intestinal lumen, where it arises as a result of bacterial activity. However, it must be kept in mind that pyridoxal phosphate enzymes tend to dissociate in tissue extracts:

$$\text{decarboxylase} \rightleftharpoons \text{codecarboxylase} + \text{apodecarboxylase}.$$

Such a dissociation of the enzyme may easily occur in extracts when the codecarboxylase concentration is lowered by dilution. It is known that such extracts often have higher activity when the codecarboxylase, pyridoxal-5-phosphate is added *in vitro*. Experiments with isotopically labelled histamine and histidine make it very likely that the principal site of histamine formation is in the cell that stores histamine.

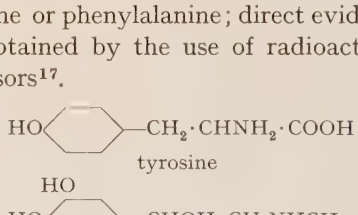
The low rate of histamine synthesis becomes apparent when animals are depleted of histamine. Feldberg and Talesnik[12] have depleted animals of skin histamine by the use of the histamine releaser, compound 48/80; it is remarkable how long it takes until the stores of histamine are replenished.

The biosynthesis of HT is somewhat more complex; this is explained by the fact that the parent compound, tryptophan, differs from the amine in two points: (a) in the absence of the carboxyl group, and (b) in the presence of the hydroxyl group in position 5 on the indole ring. Thus, two pathways are theoretically possible, and the work of Udenfriend, Clark and Titus[13] has shown that in the biosynthesis decarboxylation follows upon the introduction of the hydroxyl group:



Little is known about the enzyme that oxidizes tryptophan to 5-hydroxytryptophan. More is known about the specific 5-hydroxytryptophan decarboxylase; it is a pyridoxal enzyme; it occurs not only in the kidneys[14], but also in large amounts in the intestine and in the nervous system[15]. In the latter, most is found in the hypothalamus and, interestingly, also in sympathetic ganglia. The localization of the enzyme in the hypothalamus is not surprising; like brain sympathin, brain HT is particularly concentrated in the hypothalamus (and the brain stem), but the sympathetic ganglia are not found to be particularly rich in HT. The enzyme has been shown to occur in large amounts in a metastasis of an enterochromaffine tumour[16].

Although the chemical composition of the catecholamines has been established for a long time, the elucidation of their biosynthesis has been slow. The reason for this is easily understood; adrenaline is derived from tyrosine or phenylalanine; direct evidence of this has been obtained by the use of radioactive amino acid precursors[17].

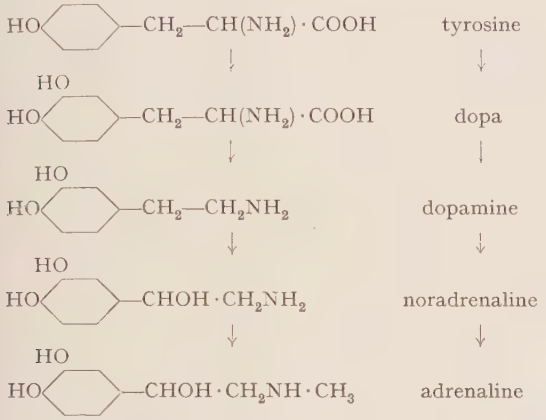


Since adrenaline differs from tyrosine in four different points, many different pathways of biosynthesis are theoretically possible. In 1938, Holtz, Heise and Lüdtke[18] discovered in the mammalian kidney the enzyme dopa decarboxylase: this enzyme catalyzes the formation of dopamine from L-dopa; this led to the suggestion that this reaction was one of the intermediate steps in the biosynthesis of adrenaline and of

[10] E. Werle and H. Herrmann, Biochem. Z. *291*, 105 (1937).
[11] N. G. Waton, Brit. J. Pharmacol. *11*, 119 (1956).
[12] W. Feldberg and J. Talesnik, J. Physiol. *120*, 550 (1953).
[13] S. Udenfriend, C. T. Clark, and E. Titus, J. Amer. chem. Ass. *75*, 501 (1953).
[14] C. T. Clark, H. Weissbach, and S. Udenfriend, J. biol. Chem. *210*, 139 (1954).
[15] J. H. Gaddum and N. J. Giarman, Brit. J. Pharmacol. *11*, 88 (1956).
[16] H. Langemann and J. Kägi, Klin. Wschr. *34*, 237 (1956).
[17] S. Gurin and A. M. Delluva, J. biol. Chem. *170*, 545 (1947). – S. Udenfriend and A. J. B. Wyngarden, Biochim. biophys. Acta *20*, 48 (1956).
[18] P. Holtz, R. Heise, and K. Lüdtke, Arch. exp. Path. Pharmak. *191*, 87 (1937).

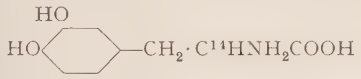
sympathin. The discovery of the role of noradrenaline as the adrenergic mediator (v. Euler[19]) gave support to the idea that a primary amine occurred as the precursor of adrenaline.

Experimental support for the scheme given below was first obtained by Langemann[20], who showed that the chromaffine tissue is extremelly rich in dopa decarboxylase.



This observation, which has since been confirmed and extended to many other vertebrate species, shows that the presence of this amine-forming enzyme is a characteristic of the phaeochrome tissue. It is now known that the dopa decarboxylase is also present in adrenergic nerves[21]. This is further support for the suggestion that the enzyme is concerned with the elaboration of sympathin in the organism.

These findings have led to a search for an enzyme which would convert dopamine to noradrenaline. Two years ago, it was shown that dopa, labelled in the α position with carbon 14, when incubated with bovine



medullary homogenates, gave rise not only to radioactive dopamine, but also to small amounts of radioactive noradrenaline[22]. This observation was followed up by Hagen[23], who isolated the radioactive dopamine and then incubated it with a homogenate from chick suprarenal gland; in this way the conversion of dopamine to noradrenaline could be directly demonstrated. Observations have since been reported which indicate that the same reaction occurs in the adrenal medullary tissue of the ox[24], the cat [25] and the rat[26]. It therefore seems that this mode of formation of the pressor amines is widely distributed, possibly common to all vertebrates. We can therefore say that today, 100 years after the first demonstration of the medullary hormone, its mode of synthesis can be considered as established in broad outlines, although many interesting details, especially the mechanism of the methylation reaction[27] remain to be cleared up.

These recent findings raise the question: what is the functional significance of dopamine? Its presence in human urine has been known for some time[28], and its occurrence in the adrenal medulla has also been demonstrated[29,30]. In chromaffine tissue, only very small quantities of dopamine occur; this suggests that in this tissue, like a true metabolic intermediate, it is not stored. Schümann[30] has recently shown that in adrenergic nerves this appears to be different; here the amounts of dopamine found are comparable with those of noradrenaline present. This suggests the possibility that dopamine has some regulating functions of its own which are not yet known. In this connexion, it seems worth while to remember that in many species the kidneys are very rich in dopa decarboxylase, but no renal function of dopamine has hitherto been demonstrated.

B. *Biological Inactivation of Biogenic Amines*

It is not proposed here to discuss the different modes of biological inactivation in detail. The amines owe their characteristic biological properties to the presence of the basic nitrogen, and it is therefore not surprising to find that inactivation is often brought about by removal of the amino group. This removal is catalysed by enzymes known as amine oxidases. Oxidative deamination by amine oxidases leads to the formation of an aldehyde, but the aldehyde is usually further oxidized to the corresponding carboxylic acid. In this way, the excretion of 5-hydroxyindoleacetic acid has been used as a measure of the turnover of HT in the body. Similarly, imidazoleacetic acid has been demonstrated as an important end product of metabolism of histamine. However, the possibility that other pathways of inactivation exist, should be borne in mind.

It is certain that oxidative deamination by amine oxidases is not the only way in which amines are destroyed. Only for HT has no other pathway of inactivation so far been described. For histamine, alternative pathways of inactivation have been discussed in detail at the recent CIBA Symposium on Histamine (see[9]).

It is the fate of the catechol amines in the animal organism which is still very imperfectly known. Adrenaline and noradrenaline are both substrates of amine oxidase *in vitro*, and experience gained by the use of isotopically labelled amines makes it likely that some

[19] U. S. v. Euler, Ergebn. Physiol. *46*, 261 (1950).
[20] H. Langemann, Brit. J. Pharmacol. *6*, 318 (1951).
[21] P. Holtz and E. Westermann, Arch. exp. Path. Pharmak. *227*, 538 (1956).
[22] D. J. Demis, H. Blaschko, and A. D. Welch, J. Pharmac. *117*, 208 (1956).
[23] P. Hagen, J. Pharmac. *116*, 26 (1956).
[24] R. Neri, M. Hayano, D. Stone, R. I. Dorfmann, and F. Elmadjan, Arch. Biochem. *60*, 297 (1956).
[25] N. Kirshner and McC. Goodall, Fed. Proc. *16*, 110 (1956).
[26] L. C. Leeper and S. Udenfriend, Fed. Proc. *15*, 298 (1956).
[27] W. G. Verly, Arch. int. Physiol. Biochem. *64*, 309 (1956).
[28] U. S. v. Euler, U. Hamberg, and S. Hellner, Biochem. J. *49*, 655 (1951).
[29] McC. Goodall, Acta physiol. scand. *24*, suppl. 85 (1951). – D. M. Shepherd and G. B. West, J. Physiol. *120*, 15 (1953).
[30] H. J. Schümann, Arch. exp. Path. Pharmak. *227*, 566 (1956).

at least of the adrenaline and noradrenaline is metabolized by amine oxidase *in vivo*[31]. However, this oxidation is a slow process, and it appears likely that other mechanisms of inactivation of these two amines will be found to play an important part. Here is a gap in our knowledge which remains to be filled.

The third catechol amine, dopamine, is readily oxidized by amine oxidase, and there is no reason to doubt that this enzyme is active as a catalyst of biological inactivation of dopamine in the living organism.

C. *Storage of Biogenic Amines*

The development of methods for the study of isolated cell organelles *in vitro* has in recent years greatly contributed to our knowledge of the storage of biogenic amines in the cell.

It has been found that in the cell amines are stored in cytoplasmic granules. Granules of this kind have been known to the histologists for a long time, but it has now been found possible to isolate the granules and obtain them in suspensions. A method which has been found useful for isolation of these granules is the differential centrifugation of tissue homogenates in sucrose solution; isotonic or hypertonic solutions of sucrose have been used. In this way it has been demonstrated that histamine[32], adrenaline and noradrenaline[33] and HT[34] are stored in granules.

Each amine is probably stored in more than one type of cell, but it appears that for each of the three groups of amines one specific storage site is especially important. For histamine, this cell is the mast cell, which stores in its granules both histamine and heparin[35]. The catechol amines are stored in the chromaffine cells and in the related adrenergic nerve cells. Erspamer[36] and others see in the enterochromaffine (or argentaffin) cells of the gastro-intestinal tract the specific storage cell for HT, but the suggestion has been made by Jacobson[37] that the storage site is in a different type of cell, known as argyrophil (see also Lillie[38]).

The granules which store the catechol amines and those which store histamine have certain characteristics in common:

(a) they contain the amines in a form in which they are not immediately available to exert their full biological action[39]; however, upon treatment with distilled water the amines are released; they are then able to exert their full effect. These observations are in agreement with the idea that the granules are provided with membranes that have properties similar to those of cell membranes.

(b) The granules contain specific anions which appear to be important in the binding of the amines. In the mast cell granule, this anion is heparin, in the chromaffine cell it is adenosinetriphosphate (ATP). The high concentration of ATP in the bovine adrenal medulla was discovered by Högberg, Hillarp and Nilson[40], and it has since been shown that the distribution of amines and ATP over the different granular fractions obtained from the chromaffine cell by differential centrifugation is very similar[41]. The concentration of ATP in the amine-carrying granules of the suprarenal medulla is extremely high; 5 to 10% of the dry weight of these granules is ATP. This is a concentration of ATP of an order of magnitude different from that hitherto found in other cells. It is of interest that the blood platelets have recently been found to be rich in ATP[42]. This is interesting as the platelets are known to act as carriers of amines.

The analysis of the chromaffine granules by differential centrifugation has recently been supplemented by a study of the chromaffine cell with the electron microscope[43]. This study has shown that the chromaffine granules are clearly distinct from the mitochondria; they are of smaller size than the latter. Valuable evidence on the existence of a granular membrane has also been obtained.

One hundred years ago, Vulpian described the 'granulations moléculaires' of the adrenal medullary cell. Recent work has shown that these structures are important in the storage, and possibly also in the formation, of the medullary amines.

Zusammenfassung

Die Entdeckung der Farbreaktionen der Nebennierenmarksubstanz durch Vulpian vor 100 Jahren gibt den Anlass zu diesem Überblick über den gegenwärtigen Stand unseres Wissens vom Stoffwechsel der pharmakologisch wirksamen biogenen Amine. Die Bildung des Histamins, des 5-Oxytryptamins und der Katecholamine (Noradrenalin und Adrenalin) und der Anteil der Aminoxydasen an der biologischen Inaktivierung der Amine wird besprochen. Zum Schluss werden die Ergebnisse der Granulaforschung in den letzten Jahren erwähnt und die Bedeutung dieser cytoplasmatischen Strukturen für die intracelluläre Speicherung der biogenen Amine sowie einige Eigenschaften der Granula diskutiert.

[31] R. W. Schayer and R. L. Smiley, J. biol. Chem. *202*, 425 (1953). – R. W. Schayer, R. L. Smiley, K. J. Davis, and Y. Kobayashi, Amer. J. Physiol. *182*, 285 (1955).

[32] J. H. Copenhaver, M. E. Nagler, and A. Goth, Fed. Proc. *12*, 314 (1953). – P. Hagen, Brit. J. Pharmac. *9*, 100 (1954).

[33] H. Blaschko and A. D. Welch, Arch. exp. Path. Pharmak. *219*, 17 (1953). – N. A. Hillarp, S. Lagerstedt, and B. Nilson, Acta physiol. scand. *29*, 251 (1953).

[34] H. Blaschko, J. M. Himms, L. Martini, and J. M. Walker, Unpublished observation. – N. J. Giarman, Unpublished observation.

[35] J. F. Riley, Pharmac. Rev. *7*, 267 (1955).

[36] V. Erspamer, *Il sistema cellulare enterocromaffine e l'enteramina*, Rendiconti Scientifici Farmitalia, Vol. 1 (1954).

[37] W. Jacobson, *Ciba Foundation Symposium on Chemistry and Biology of Pteridines* (Churchill, London 1954), p. 314.

[38] R. D. Lillie, J. Histochem. and Cytochem. *4*, 120 (1956).

[39] H. Blaschko, P. Hagen, and A. D. Welch, J. Physiol. *129*, 27 (1955).

[40] B. Högberg, N.-A. Hillarp, and B. Nilson, *3me Congrès International de Biochimie*, Résumé des communic. (1955), p. 72.

[41] H. Blaschko, G. V. R. Born, A. D'Iorio, and N. R. Eade, Biochem. J. *62*, 18 P (1956); J. Physiol. *132*, 44 P (1956). – B. Falck, N.-A. Hillarp, and B. Högberg, Acta physiol. scand. *36*, 360 (1956).

[42] G. V. R. Born, Biochem. J. *62*, 33 P. (1956).

[43] J. D. Lever, Endocrin. *57*, 621 (1955). – F. S. Sjöstrand and R. Wetzstein, Exper. *12*, 196 (1956).

Die Reizbewegungen der Mimosoideen und ihre Hormone* **

Von Gerhard Hesse, Basudev Banerjee[1] und Hermann Schildknecht

Überall in unseren Gewächshäusern findet man heute die «Sinnpflanze» *Mimosa pudica* L., deren Heimat das tropische Amerika ist, die sich aber als Unkraut über den gesamten Tropengürtel verbreitet hat (Fig. 1). Der vielgereiste Arzt und Naturforscher Carolus Clusius stellte sie 1608 seinen Zeitgenossen mit folgenden Sätzen vor: «Die Natur dieser Pflanze ist so merkwürdig, dass der menschliche Geist ihr nicht nachkommen kann. Denn wenn sie am schönsten grünt, ist sie lieblich anzusehen. Wenn sie jemand anzufassen wünscht, zieht sie sofort die Blätter zusammen und verbirgt sie unter die zarten Zweigchen. Wenn man sie aber anfasst, wird sie plötzlich so welk, dass man glaubt, sie vertrockne. Was aber noch bewunderungswürdiger ist: wenn man die Hand zurückzieht, gewinnt sie (sofort)

Fig. 1.
Blühender Zweig von *Mimosa pudica* (etwas verkleinert).
G. Hesse phot.

ihren früheren Glanz zurück, und so oft wird sie welk und ergrünt wieder, als man sie anfasst und die Hand zurückzieht. Mir ist aber berichtet worden, ein gewisser Philosoph in Malabar sei über dem zu grossen Eifer, die Natur dieser Pflanze zu ergründen, verrückt geworden.»

Es handelt sich also um den nicht gerade häufigen Fall, dass eine Pflanze mit ihren Blättern rasche, weithin sichtbare Bewegungen ausführt, wenn ein äusserer *Reiz* sie trifft. Dieser kann eine Berührung oder Erschütterung sein oder durch Säuren, Laugen oder andere Chemikalien veranlasst werden. Am schönsten sieht man die Erscheinung, wenn die Spitze eines Blattes mit einer Flamme angesengt wird.

Was man weiter bemerkt, ist eine *Reizleitung*. Von der gesengten Stelle aus klappen zuerst die Fiederblättchen des betroffenen Blattstrahls zusammen; dann läuft die Bewegung die benachbarten Strahlen aufwärts, sie legen sich zusammengefaltet gegeneinander, und schliesslich neigt sich auch der Blattstiel zum Stamm hin. Nach langer Zeit, wenn man den Vorgang schon beendet glaubt, beginnt bei anderen Blättern aufwärts und abwärts am Stamm das gleiche Spiel.

Der arme Philosoph aus Malabar hat nichts zur Klärung dieser Vorgänge beigetragen. Seitdem haben sich viele Forscher um das Rätsel der Mimose bemüht. Einen entscheidenden Einblick gewann Ricca[2], als er feststellte, dass der Reiz durch eine chemische Substanz weitergetragen werden kann, also durch ein pflanzliches *Hormon*. Er durchschnitt den Stamm einer

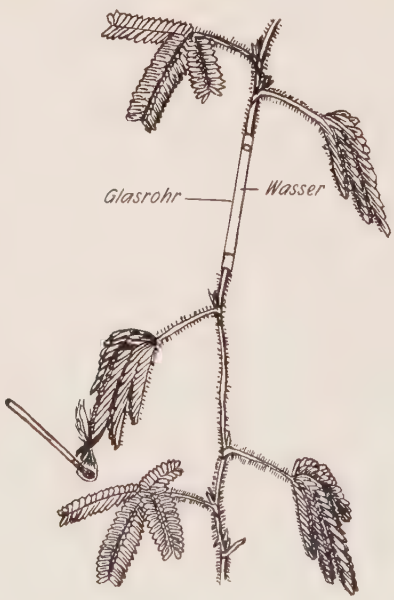


Fig. 2.
Reizleitung: Das angesengte Blatt klappt zusammen und senkt sich; nach einiger Zeit erfolgt an den Nachbarblättern das gleiche – selbst dann noch, wenn der Zweig durchschnitten ist und nur eine wassergefüllte Röhre die Teile zusammenhält.

* Herrn Prof. Arthur Stoll zum 70. Geburtstag gewidmet.

** Aus dem chemischen Institut der Universität Freiburg i. Br. und dem Institut für organische Chemie an der Universität Erlangen.

[1] Mein lieber Freund Dr. B. Banerjee hat die Fortsetzung dieser Untersuchung nicht mehr erlebt. Noch während seines Aufenthalts in Deutschland überfiel ihn die tückische Krankheit, der er kurz nach seiner Heimkehr erlag.

[2] U. Ricca, Nuovo G. bot. ital., N. s. *23*, 52 (1916).

Pflanze und fügte das abgeschnittene Ende dem Stumpf wieder an, ein wassergefülltes Stück Glasrohr dazwischen. Der Bewegungsreiz ging dann über eine solche Stelle hinweg (Fig. 2). Damit ist die Reizbewegung der Mimose auch zu einem chemischen Problem geworden.

Es zeigte sich auch, dass eine wässerige Abkochung von Mimosenblättern das Hormon reichlich enthält. Stellt man nämlich ein abgeschnittenes Blatt von *Mimosa pudica* in Wasser ein (Fig. 3), so entfaltet es sich nach einigen Minuten wieder wie an der Pflanze selbst. Tauscht man dann vorsichtig genug die «Vase» gegen eine andere aus, die ebenfalls nur Wasser enthält, so bleibt das Blatt ausgebreitet. Es faltet sich aber nach einigen Sekunden oder Minuten zusammen, wenn diese andere Vase mit dem Kochsaft gefüllt ist. Hierauf haben wir einen *Test* aufgebaut[3], mit dem das Hormon nachgewiesen und seine Menge abgeschätzt werden kann. Dazu wurde die Lösung so lange verdünnt, bis der Erfolg unsicher wurde. Eine Lösung, die innerhalb von 20 min bei 3 von 6 Blättern die Reaktion noch auslöst, nennen wir eine Grenzlösung, ihren Gehalt die *Grenzkonzentration*. Die Abkochung von 1 g frischen Mimosenblättern kann man im allgemeinen auf 0,1 l verdünnen, bis diese Grenze erreicht wird.

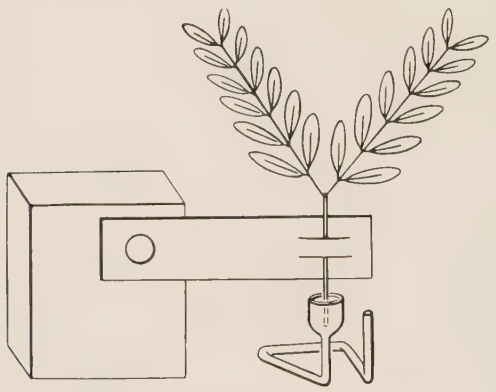


Fig. 3.
Testanordnung. In der schematischen Zeichnung ist ein zweistrahliges Blatt von *Mimosa pudica* dargestellt. Die normalen Blätter haben vier Strahlen.

Mit einer ähnlichen Methode hatte vor uns schon H. Fitting[4] ausgedehnte Untersuchungen angestellt. Seine Zahlenwerte sind aber mit unseren nicht unmittelbar zu vergleichen, weil die Bedingungen andere waren. Er fand, dass sehr viele Chemikalien in hoher Konzentration die Bewegungen auslösen können; sie wirken dann unspezifisch als Reiz, wie das Feuer oder die Berührung. In grösserer Verdünnung waren nur einige Anthrachinonderivate und α-Aminosäuren wirksam, besonders das Alanin. Man glaubte daher lange Zeit, dass der Reizstoff eine Aminosäure sein müsse.

Fitting hat auch zuerst versucht, das Hormon der Mimose zu *isolieren*. Aus seinen Experimenten schien hervorzugehen, dass es eine recht beständige Säure ist. Sie wurden später in Graz von dem Chemiker Soltys zusammen mit dem Botaniker Umrath[5,6] erfolgreich weitergeführt. Diese fanden zunächst, dass die Mimose auch auf die Kochsäfte anderer sensitiver Pflanzen anspricht. Aus praktischen Gründen wählten sie *Neptunia plena* als Hormonlieferanten, prüften die Lösungen aber an Blättern von *Mimosa pudica*. Sie konnten Präparate erhalten, die noch in der Verdünnung $1:10^8$ wirksam waren. Sie haben solche Konzentrate auch analysiert und das Molekulargewicht der wirksamen Substanz nach einem Diffusionsverfahren ermittelt. Sie fanden es auffallend klein, unter 250. Die saure Natur des Hormons wurde von ihnen bestätigt. Aber in einem anderen Punkt stimmen sie mit Fitting nicht überein: während dieser seine Hormonlösungen bis zu acht Jahre ohne Abnahme der Wirksamkeit aufheben konnte, erwies sich ihr angereichertes Hormonpräparat als äusserst zersetzlich. Nach wenigen Stunden war oft die Arbeit von Wochen verloren.

Gleichzeitig mit den Arbeiten von Soltys an *Neptunia plena* haben wir[3] die Arbeit am Wirkstoff von *Mimosa pudica* selbst begonnen. In allen Reinigungsschritten verhielt er sich vollkommen gleich, und wir teilen daher die Ansicht, dass es sich um denselben Stoff handelt. Auch er wird von einer bestimmten Reinheitsstufe an unbeständig, aber nur bei Zutritt von Luft. Wird diese ausgeschlossen, so kann man das Hormon ohne Verlust an Wirksamkeit sogar auf 200° erhitzen (mit B. Banerjee). Es liess sich zeigen, dass bei der Inaktivierung *Sauerstoff* verbraucht wird. Auch der Versuch, dem oxydierten Hormon den Wasserstoff wieder zurückzugeben, war erfolgreich. Leitet man in eine unwirksam gewordene Hormonlösung Schwefelwasserstoff ein, so kehrt ihre Wirksamkeit teilweise zurück und die Lösung trübt sich durch ausgeschiedenen Schwefel. Verwendet man bei der Herstellung der Blattextrakte Wasser, das mit Schwefelwasserstoff gesättigt wurde, so erhält man etwa fünfmal so wirksame Hormonlösungen als mit Wasser allein.

Bevor der Zusammenhang der Inaktivierung mit dem Luftsauerstoff erkannt war, wurde versucht, die empfindliche Substanz dadurch zu schonen, dass das Kochen vermieden wurde. Frische Triebe von *Mimosa pudica* wurden auf einer hydraulischen Presse bei 300 at ausgepresst. Ein solcher Preßsaft war wohl wirksam, verlor aber seine Aktivität schon in wenigen Minuten unter Aufnahme von Sauerstoff. Kocht man ihn gleich nach der Gewinnung, so absorbiert er keinen Sauerstoff mehr und ist jahrelang haltbar, wenn er mit etwas Toluol steril gehalten wird. Setzt man aber etwas frischen Preßsaft dieser haltbaren Hormonlösung zu, so verbraucht sie wieder Sauerstoff und verliert dabei ihre Aktivität rasch.

[3] G. Hesse, Biochem. Z. *303*, 152 (1939).
[4] H. Fitting, Jb. wiss. Botanik *83*, 270–314 (1936).
[5] A. Soltys und K. Umrath, Biochem. Z. *284*, 247 (1936).
[6] A. Soltys, K. Umrath und Ch. Umrath, Protoplasma *31*, 454 (1938).

Das Rätsel der *Restitution* war damit gelöst, die Frage nämlich, wie es möglich ist, dass die Pflanze nach Beendigung eines Reizes ihre normale Gestalt wieder annimmt. Eine gereizte Pflanze ist ja mit dem Hormon durchsetzt; seine Ausscheidung kann bei dem langsamen Stofftransport der Pflanzen unmöglich so rasch vor sich gehen, wie die Erholung tatsächlich geschieht. Selbst die Abgabe als Gas ist ausgeschlossen, denn es ist weder beim Kochen mit dem Wasserdampf flüchtig noch im Hochvakuum bei 200° destillierbar. Die Versuche zeigen nun, dass im Zellsaft der Mimose ein Ferment vorhanden ist, das das Hormon in wenigen Minuten durch Oxydation unwirksam macht. Das Ferment wird beim Kochen zerstört, und dadurch wird die aufgekochte Lösung luftbeständig. Der erforderliche Sauerstoff ist in einer assimilierenden Pflanze stets reichlich vorhanden. Im Schatten erfolgt die Restitution langsamer, und bei Nacht nimmt die Pflanze ihre Reizstellung ein: sie «schläft». Man versteht nun auch die hohe Wärmetönung, die mit den Reizbewegungen der Mimose verbunden ist. Bei der Ausschüttung des Reizstoffs beginnt alsbald seine Oxydation, also die Verbindung von molekularem Sauerstoff mit Wasserstoff des Hormons zu Wasser. Man kann abschätzen, dass diese Umsetzung viel Wärme freimachen muss, denn das Hormon gibt seine Wasserstoffatome leichter her als das Wasserstoffmolekül; selbst dieses reagiert aber mit Sauerstoff unter grosser Wärmeentwicklung.

Die Luftempfindlichkeit der Hormonpräparate und ihre saure Natur sind charakteristische Eigenschaften einer Körperklasse, die man *Reduktone*[7] nennt. Das bekannteste Redukton ist Vitamin C, die Askorbinsäure. Andere Reduktone kann man aus Zuckern erhalten, wenn man sie für kurze Zeit mit Laugen erwärmt. Alle Reduktone geben eine Reihe von charakteristischen chemischen Reaktionen, und alle diese fanden wir an unseren Hormonlösungen und -konzentraten wieder. Daher kommen wir zu der Auffassung, dass das Bewegungshormon in dieser Stoffklasse zu suchen ist.

Diese Meinung besteht nicht ohne Widerspruch. Aus seinen umfassenden Modellversuchen mit mehr als 1500 chemischen Stoffen hatte FITTING[4] geschlossen, dass es eine Aminosäure sein müsse. SOLTYS[5,6] und UMRATH, die auf dem Wege der Isolierung am weitesten vorgestossen sind und sogar eine reversible Azetylierung durchgeführt haben, schlossen auf eine Amino- oder Oxysäure. BANERJI, BHATTACHARYA und BOSE[8] schrieben dem Reizstoff «ungesättigte Kohlenstoffatome in Doppel- oder Dreifachbindung» zu und vermuteten ein Karotinoid, evtl. Crocetin als wirksamen Stoff. Eine andere aktive Fraktion reihen sie in die Verwandtschaft der Gerbstoffe ein.

Es muss hier auf eine *Unsicherheit des Testverfahrens* eingegangen werden, die darauf beruht, dass das unwirksam gewordene Hormon durch Reduktionsmittel wieder aktiv werden kann. Das für den Test vorbereitete Blatt ist durch das Abschneiden und Hantieren stark gereizt worden, also nach unseren Befunden auch nach der Erholung noch mit dem oxydierten Hormon durchsetzt. Jedes starke Reduktionsmittel, das darin aufsteigt, kann also durch eine chemische Umsetzung wieder aktives Hormon bilden und dadurch die Bewegungen auslösen. So wirken zum Beispiel Askorbinsäure, Schwefelwasserstoffwasser und Dithionitlösungen bei hinreichender Konzentration. Wir glauben, dass auch die Hormonwirkung der α-Aminosäuren so zu verstehen ist, dass sie auf dem Wege über eine fermentativ katalysierte Wasserstoffübertragung nach Art der Stickland-Reaktion zu Reduktionsmitteln für das oxydierte Hormon werden. Eine sichere Unterscheidung zwischen dieser mittelbaren Hormonwirkung und der unmittelbaren ist kaum möglich. Wir glauben aber doch eine grössere Sicherheit für die Beurteilung der Teste zu haben, wenn wir gegenüber FITTING die Beobachtungszeit abkürzen und ausserdem verlangen, dass die Reizbewegung typisch verlaufen muss. Untypisch ist sie zum Beispiel beim Alanin in höherer Verdünnung: man findet dann, dass die Faltung einige Fiederblättchen überspringt oder nicht bis zur Blattspitze fortschreitet, so dass solche Blätter ein «struppiges» Aussehen annehmen.

Wir haben unsere Reduktonhypothese weiter verfolgt und zunächst die *chromatographische Reinigung* an basischem Aluminiumoxyd[3] genauer untersucht. Wir fanden (mit Dr. BANERJEE), dass es mehrere hormonwirksame Stoffe gibt, da zwei getrennte Zonen den typischen *Mimosa*test geben. Beide reduzieren auch TILLMANS Reagens, und dies ist eine der sichersten Nachweismethoden für Reduktone. Durch Hochvakuumdestillation bei 200° konnte aber aus einem Hormonkonzentrat noch ein Stoff erhalten werden, der zwar auch die Reduktionswirkung hat, im Pflanzentest aber unwirksam ist. Es ist daher leider nicht möglich, den Hormongehalt der Lösungen durch Titration mit TILLMANS Reagens zu bestimmen, und auch qualitativ kam man zunächst noch nicht ohne den Pflanzentest aus. Die *Papierchromatographie* (mit Dr. SCHILDKNECHT) führt hier weiter, da sie ausser der gruppenspezifischen Farbreaktion noch die für jeden Stoff kennzeichnende Lage im Chromatogramm, den R_f-Wert ergibt. Ausserdem ist sie überaus empfindlich und kann deshalb mit kleinsten Mengen noch durchgeführt werden. Benutzt wurde sie in aufsteigender Form mit der von WEYGAND[9,10] für Reduktone ausgearbeiteten Lösungsmittelkombination Butanol-Eisessig-Wasser 4:1:5 (obere Phase), weil für diese schon

[7] H. v. EULER und H. HASSELQUIST, *Die Reduktone* (Verlag Enke, Stuttgart 1950).

[8] B. BANERJI, G. BHATTACHARYA und D. M. BOSE, Trans. Bose Res. Inst. *16*, 1944 bis 1946, 155 (1946).

[9] F. WEYGAND, Arkiv Kemi *3*, 11 (1950).

[10] S. M. PARTRIDGE und L. W. MAPSON, Biochem. J. *164*, 479 (1949).

eine Reihe von R_f-Werten bekannt sind; notwendig war das Arbeiten unter Schwefelwasserstoff oder Kohlendioxyd wegen der Luftempfindlichkeit der Stoffe, die bei der grossen Oberfläche des Papieres und der langen Zeitdauer solcher Analysen stark ins Gewicht fällt. Von den beiden Schutzgasen ist ersteres vorzuziehen, weil es nicht nur die weitere Oxydation verhindert, sondern auch eine bereits eingetretene wieder rückgängig machen kann. Wir haben aber die Beobachtung gemacht, dass Schwefelwasserstoff zusammen mit den organischen Dämpfen besonders giftig ist. Wir arbeiten daher nicht nur unter einem Abzug, sondern zusätzlich noch mit einer Atemmaske und unter grosser Vorsicht.

Es zeigte sich bald, dass die bearbeiteten Pflanzenextrakte eine *grosse Zahl von Stoffen* enthalten, die durch das Tillman-Reagens oder mit Titantrichlorid und Pyridin nach Weygand[11] angezeigt werden. Nicht alle diese Stoffe werden Reduktone sein, aber es scheint doch so, dass diese Körperklasse, von der bisher nur ganz wenige Vertreter als Naturstoffe aufgefunden worden sind, eine recht grosse Verbreitung hat. Die übliche Bestimmungsmethode für Vitamin C in Nahrungsmitteln bedarf deshalb einer Überprüfung.

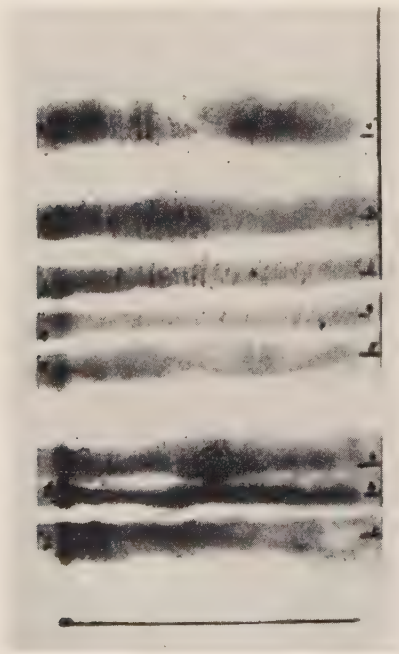


Fig. 4

Fig. 4. Chromatogramm eines Extraktes aus *Mimosa spegazzini*. Aufsteigend, Butanol-Eisessig-Wasser 4 : 1 : 5, hervorgerufen mit Titantrichlorid-Pyridin und Luftoxydation.

Trägt man die Analysenlösung auf dem Papier als Tropfen auf, wie es üblich ist, so überdecken sich die bei der Analyse erhaltenen Farbflecken teilweise. Es war daher besser, mit einer Reissfeder längs der Startlinie einen langen feinen Strich aufzubringen. Nach der Entwicklung findet man die Bestandteile dann in parallelen Bändern übereinander angeordnet (Fig. 4). Um aus dieser Musterkarte der reduzierenden Substanzen die hormonal wirksamen herauszufinden, mussten

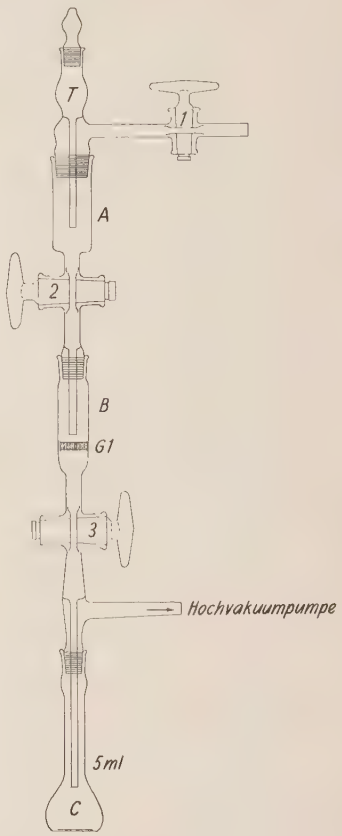


Fig. 5. Anordnung zur Extraktion luftempfindlicher Stoffe aus dem zerschnittenen Papierchromatogramm

sie einzeln ohne Veränderung durch die Nachweisreaktion an Mimosenblättern getestet werden. Auch dies lässt sich bei der abgewandelten Methode leicht durchführen, wenn man die Farbentwicklung nur mit zwei abgeschnittenen Randstreifen durchführt und diese dann zur Markierung benutzt, indem man den ungefärbten Hauptstreifen entsprechend der Lage der Zonen zerschneidet. Die einzelnen schmalen Streifen wurden in einer Spezialanordnung (Fig. 5) eluiert und anschliessend getestet.

Der aufgerollte Streifen wird in *A* bei geschlossenem Hahn *2* und offenem Hahn *1* fünfmal nacheinander durch *T* mit soviel Schwefelwasserstoffwasser versetzt, dass er vollständig eintaucht. Man saugt jedesmal die erhaltene Lösung in das Messkölbchen *C* ab und verdampft sie dort vollständig im Hochvakuum unter Erwärmung mit Heissluft (Föhn), wobei Hahn *3* geschlossen wird. Zum Schluss verreibt man den Streifen in einem kleinen Mörser mit Schwefelwasserstoffwasser und filtriert den Papierbrei unter Saugen durch die Fritte *G1*. Wenn auch diese letzte Charge im Hochvakuum eingedampft ist, gibt man einige kleine Stückchen Trockeneis in das Messkölbchen und verschliesst es mit einem lose aufgesetzten Stopfen. Erst unmittelbar

[11] F. Weygand und E. Csendes, Ber. dtsch. chem. Ges. *85*, 45 (1952).

vor dem Test versetzt man den Rückstand mit einer genau abgemessenen Menge abgekochten Wassers oder füllt *C* bis zur Marke damit auf.

Auf diese Weise wurden im Extrakt von *Mimosa spegazzini* zwei hervorragend wirksame Fraktionen mit den R_f-Werten 0,11 und 0,23 und zwei gut wirksame mit den Werten 0,42 und 0,55 ermittelt, während die Zonen mit den R_f-Werten 0,48, 0,65 und 0,78 kaum oder gar nicht wirksam waren. Auch die aktiven Lösungen verloren ihre Wirksamkeit beim Stehen an der Luft in einigen Stunden.

Die nahe verwandte Art *Mimosa spegazzini* mit gelben Blüten gleicht *M. pudica* sehr im Aussehen und in den Reizbewegungen, aber sie ist weniger empfindlich. An *Pudica*blättern getestet, übertrifft die Hormonlösung aus *M. spegazzini* jedoch die aus *M. pudica* ausserordentlich; sie ist etwa fünfzigmal so wirksam. Das Papierchromatogramm enthält neun deutliche Zonen, die grösstenteils mit den Zonen aus *M. pudica* zusammenfallen (Tabelle II, S. 17). Alle vier als wirksam angesprochenen Stoffe finden sich in beiden Arten. Auch *andere Pflanzenkochsäfte*, selbst solche aus nichtsensitiven Pflanzen, können die Reizbewegungen an *M. pudica* auslösen. In der Hoffnung, ein leichter zugängliches Material für die Isolierung der eigentlichen Hormone zu bekommen, haben wir verschiedene Pflanzen getestet und teilen im folgenden die Grenzverdünnungen der Kochextrakte mit (Tabelle I):

Tabelle I. Grenzverdünnungen der wässerigen Abkochungen von verschiedenen Pflanzen, getestet an *Mimosa pudica*

Mimosa pudica	1 g/ 100 ml
Mimosa spegazzini	1 g/5000 ml
Neptunia plena[5]	1 g/ 200 ml
Dionaea muscipula . . .	1 g/ 1 ml
Biophytum sensitivum . .	1 g/ 1 ml
*Thea chinensis**:	
a) Grüner Tee	1 g/ 750 ml
b) Schwarzer Tee . . .	1 g/ 500 ml
Robinia pseudacacia . . .	1 g/ 100 ml

* Getrocknete Blätter.

Die Ergebnisse an sensitiven Pflanzen aus anderen Familien sind verhältnismässig enttäuschend. Bereits Umrath[12] hat die Vermutung ausgesprochen, dass wahrscheinlich jede grössere Gruppe von Pflanzen, «etwa vom Range einer Familie oder Unterfamilie», ihre eigene Erregungssubstanz habe.

Überraschend ist die hohe Wirksamkeit von *chinesischem Tee*. Da obige Zahlen, weil sie an getrocknetem Material gewonnen wurden, mit den anderen Werten nicht ohne weiteres vergleichbar sind, wurde in einem besonderen Versuch lufttrockener grüner Tee mit lufttrockenen Blättern von *M. pudica* verglichen. Beide waren vorher nebeneinander im selben Glasgefäss aufbewahrt worden, damit der restliche Feuchtigkeitsgehalt sich ausgleichen konnte. Es ergab sich, dass der Teextrakt mindestens zehnmal so wirksam ist wie die Abkochung der gleichen Gewichtsmenge *Mimosa*blätter. Das Chromatogramm aus grünem Tee gab bei der Entwicklung mit Titantrichlorid noch mehr Zonen als die beiden Mimosenextrakte; nur die wichtigsten sind in untenstehender Tabelle aufgenommen.

Es war von Interesse, die einzelnen Zonen durch die bisher erprobten Reinigungsstufen hindurch zu verfolgen. Bei der Vorfällung von Verunreinigungen mit Bleiazetat bei pH < 5 werden die weiter wandernden Stoffe zum grössten Teil entfernt (Tabelle II, I). Die anschliessende Fällung der wirksamen Stoffe mit Quecksilber-II-azetat und nachfolgende Zerlegung des Niederschlags durch Schwefelwasserstoff ändert an diesem Bilde kaum noch etwas (Tabelle II, II), obwohl dabei fast 90% der gesamten Masse abgetrennt wird. Die chromatographisch erfassten wirksamen Stoffe folgen also dem Reinigungsgang, der nach dem Pflanzentest entwickelt und quantitativ kontrolliert wurde.

Tabelle II. R_f-Werte der Hauptzonen im Papierchromatogramm, kursiv gedruckt die Zonen, die sich im Mimosatest als wirksam erwiesen haben

Mimosa pudica			*Mimosa spegazzini*	*Thea chinensis*
frisch	I	II	frisch	frisch
0,87				0,83
0,79			0,78	
				0,71
0,66			0,66	
				0,62
0,55	*0,59*	*0,55*	*0,55*	
	0,49	0,50	0,48	
0,43	*0,41*	*0,43*	*0,42*	*0,43*
0,30	0,29	0,30		0,32
0,23	*0,22*	*0,21*	*0,23*	*0,24*
0,19			0,19	0,19
	0,15			
0,11	*0,10*	*0,12*	*0,11*	*0,13*

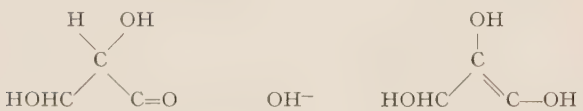
I und II bedeuten die beiden ersten Stufen der Reinigung.

Ähnliche Chromatogramme erhält man nach der Farbentwicklung mit *Tillmans Reagens*. Diese Methode trägt zur Charakterisierung der Stoffe als Reduktone Wesentliches bei, ist aber viel weniger empfindlich und gibt keine so klaren Zonenbilder. Umgekehrt ist es bei der Entwicklung mit *Triphenyltetrazoliumchlorid* und Natronlauge, die weniger spezifisch ist, aber den empfindlichsten Nachweis der Hauptzonen bei 0,23 und 0,43 erlaubt; bei höherer Konzentration findet man auch die Zone 0,11. Hier ergeben sich noch charakteristische Unterschiede in der Farbnüance und in der Zeit, nach der die Färbung erscheint. So ist die Zone 0,11 auffallend blaurot und bildet sich sofort; die starke Zone 0,23 braucht dagegen mehrere Minuten zu ihrer Ausbildung. Achtet man auf diese Besonderheiten, so wird die Identität der drei Stoffe in den verschiedenen Extrakten noch überzeugender.

[12] K. Umrath, Ergebn. Biol. *14*, 1–142 (1937).

Es scheint demnach so zu sein, dass bei der Reizbewegung der Mimosoideen die Funktion des Hormons von Stoffen übernommen wird, die auch in anderen Pflanzen vorkommen und durchaus nicht nur im Dienste der Reizübertragung stehen. Bei den sensitiven Pflanzen hat man die Möglichkeit, die Bildung dieser Stoffe (oder wenigstens ihre Sekretion) anzuregen, wenn man sie während ihrer Entwicklung sehr häufig in den Reizzustand bringt. Solche Pflanzen nehmen ein anderes Aussehen an als normal herangewachsene[13]: sie bleiben gedrungener, bilden mehr Achselsprosse, entwickeln stärkere Stacheln und Wurzeln. Der Reizstoff oder seine Begleiter hemmen also das Streckungswachstum und befördern die Zellteilung und die Differenzierung der Gewebe. Dies brachte uns auf den Gedanken, Beziehungen zu den Wuchsstoffen der *Bios*-gruppe zu suchen.

Von diesen ist der *meso-Inosit* am längsten bekannt, und es ist wie eine Fügung, dass er zuerst aus Teestaub isoliert worden ist. Zum Inosit gehört eine Reihe von Inososen, zyklischen Zuckern. Sie entstehen daraus durch verschiedene Oxydationsmittel, aber auch durch Einwirkung von *Azetobacter suboxydans* oder von tierischem Gewebe sehr leicht. Aus einem der möglichen Razemate, der *d,l-epi-meso-Inosose*, haben v. Euler und Glaser[14] kürzlich ein typisches Redukton erhalten, das sie «aci-Redukton AG» nennen. Es bildet sich bei der Einwirkung von sehr verdünnter Natronlauge schon bei Raumtemperatur, vermutlich nach folgender allgemeinen Gleichung:



$$\longrightarrow \quad HOCH_2—CH(OH)—CH(OH)—C{=}C—CHO \quad (OH\ OH)$$

Dabei entstehen mehrere Stoffe von Reduktoncharakter. Leider geben die Autoren den R_f-Wert des von ihnen isolierten reinen Reduktons für ein Lösungsmittelgemisch an, das wir nicht benutzt haben. Das rohe Spaltprodukt haben sie aber auch in dem «klassischen» System der Reduktone untersucht und finden die R_f-Werte 0,12; 0,25; 0,44; 0,50.

Die Übereinstimmung mit den vier «magischen Zahlen» unserer Kochsäfte ist verblüffend, wenn man noch berücksichtigt, dass sie absteigend und wir aufsteigend gearbeitet haben. Sie berechtigt wohl zu der Hoffnung, die Reizstoffe der Mimosoideen unter den Umwandlungsprodukten der Inososen zu finden.

[13] E. Bünning, *Entwicklungs- und Bewegungsphysiologie der Pflanze*, 3. Aufl. (Springer, Heidelberg 1953), S. 375 f.; E. Bünning und Ch. Lempenau, Ber. dtsch. bot. Ges. *67*, 10 (1953).

[14] H. v. Euler und A. Glaser, Arkiv Kemi *8*, 61 (1954).

Nur nebenbei sei erwähnt, dass die Analyse und das Molekulargewicht dieser Reduktone recht gut zu den Ergebnissen stimmen, die Soltys und Umrath für den *Neptunia*reizstoff gefunden haben:

Tabelle III

	C %	H %	N %	Molekulargewicht
Inososeredukton	40,5	5,6	—	178
*Neptunia*hormon	38–47	3,4-5,3	1,5-2,5	<250

Der Stickstoffgehalt von im Mittel 2% ist mit dem gefundenen Molekulargewicht nicht vereinbar, denn er verlangt mindestens 700. Es ist daher wahrscheinlich und wird von den Autoren auch vermutet, dass er einer Beimengung zukommt.

Wenn unsere Hypothese sich bestätigen sollte, so würden in ganz verblüffender Weise die verschiedenen Meinungen in Übereinstimmung gebracht werden, die heute noch über die Natur des Mimosenhormons bestehen. Es wäre dann eine «Oxysäure», nämlich ein saurer Stoff mit Hydroxylgruppen (Soltys und Umrath). Es wäre ein Redukton (Hesse). Es wäre eine ungesättigte organische Verbindung mit einer Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppelbindung (Banerji), und es würde schliesslich auch in die Verwandtschaft der monozyklischen Gerbstoffe gehören (Banerji), die zum Beispiel im chinesischen Tee den Inosit reichlich begleiten[15].

Die Schwierigkeit bei der Reindarstellung des Mimosenhormons, an der Soltys und Umrath wie auch wir bisher gescheitert sind, besteht in der *Zersetzlichkeit der angereicherten Präparate*. Sie ist genau so wie die fermentative Desaktivierung in der assimilierenden Pflanze an die Gegenwart von Sauerstoff oder anderen Oxydationsmittel gebunden und kann durch Schwefelwasserstoff aufgehalten und teilweise rückgängig gemacht werden. In einer früheren Arbeit[3] wurde vermutet, dass diese Autoxydation in den abgekochten rohen Pflanzenauszügen durch anwesende Reduktionsmittel, die als Inhibitoren wirken, aufgefangen wird. Erst wenn sie durch die fortschreitende Reinigung entfernt worden sind, tritt die Oxydation des Hormons wieder zutage. Es ist aber noch eine andere Erklärung möglich. Rückschauend ist uns aufgefallen, dass die Luftempfindlichkeit der vorher ganz beständigen Lösung immer nach einer Reinigungsstufe zuerst bemerkbar wird, bei der vorübergehend alkalische Reaktion geherrscht hat. Bei Soltys war es die Fällung des Bariumsalzes mit Barytwasser, in unseren Versuchen die Chromatographie an dem stark basischen Aluminiumoxyd nach Brockmann (pH etwa 10). Wenn nun in den Kochsäften hauptsächlich die Inosose vorläge

[15] R. A. Cartwright und E. A. H. Roberts, Chem. Ind. *1955*, 230. – W. Mayer, R. Bachmann und F. Kraus, Chem. Ber. *88*, 316 (1955).

(R_f 0,24)[14], die vielleicht in der Pflanze fermentativ erst in die Reduktone übergeht, im alkalischen Medium aber schon *in vitro*, so würde sich auch dieses Rätsel lösen.

Bisher gilt auf Grund der Arbeiten von H. Fitting Alanin als die beste *Modellsubstanz* für das Mimosenhormon. Wir haben es im quantitativen Test mit verschiedenen Reduktonen verglichen und fanden folgende Grenzkonzentrationen:

d,l-Alanin	0,1 %
Trioseredukton, reinst	1 %
Oxytetronsäure	1 %

Askorbinsäure, Dihydrogallussäure und Reduktinsäure waren auch in einprozentiger Lösung noch unwirksam. Ein Trioseredukton, das nach der klassischen Methode[16] aus Glucose hergestellt war und noch höhere Reduktone enthalten haben kann, erwies sich sofort nach dem Auflösen als gut wirksam (Grenzkonzentration 0,005%).

Es ist unwahrscheinlich, dass die geringe Wirksamkeit der beiden Reduktone auf mittelbare Weise (vgl. S. 15) zustande kommt, denn die unwirksamen Vertreter dieser Körperklasse sind ihnen im Reduktionsvermögen ebenbürtig, ebenso in der Säurestärke. Auch Glutathion, das ein starkes physiologisches Reduktionsmittel ist, war in einprozentiger Lösung wirkungslos. Die neuen Modelle des Reizstoffs sind zwar nicht ganz so wirksam wie Alanin, sie gleichen dem natürlichen Hormon aber in der Luftempfindlichkeit und darin, dass ihre oxydierten Lösungen durch Reduktionsmittel regeneriert werden können.

Von mehreren Reduktonen sind kürzlich einige Eigenschaften bekannt geworden[17], die vielleicht auch einiges Licht auf die *Wirkungsweise des Mimosenhormons* werfen. Die Pflanzenphysiologen sind sich darüber einig, dass die Reizbewegung auf dem Erschlaffen des Zellgewebes auf der Unterseite der Gelenkpolster beruht. Hiermit ist ein *Flüssigkeitsaustritt* aus den Zellen in die Zellzwischenräume verbunden, den man bei *Mimosa* an einer Farbänderung der Gelenke von Weisslichgrün nach reinem Grün erkennen kann. Bei anderen sensitiven Pflanzen wird die Flüssigkeit sogar nach aussen abgegeben; sie «schwitzen» bei jeder Bewegung. Da die Flüssigkeit in den Zellen unter einem Druck von mehreren Atmosphären steht, würde schon eine Erhöhung der Wanddurchlässigkeit die beobachteten Erscheinungen zur Folge haben: Zellsaft könnte austreten, und die betroffenen Zellen würden dadurch kleiner und leichter verformbar werden.

Verschiedene Reduktone haben nun tatsächlich die Fähigkeit, die Durchlässigkeit pflanzlicher und tierischer Zellwände zu erhöhen[17]. Sie vermindern ausserdem die Zähigkeit von Pektinlösungen. Ob im Zellsaft von *Mimosa pudica* Pektine enthalten sind, ist noch nicht untersucht worden, aber es ist dem Augenschein nach wahrscheinlich. Eine Verflüssigung der Pektine würde das Auspressen von Zellsaft natürlich erleichtern und beschleunigen. Es ist nachgewiesen, dass diese beiden Eigenschaften bei der Oxydation der Reduktone verschwinden.

Durch die Versuche von Ricca schien bewiesen, dass die *Reizleitung* sich des Hormones selbst bedient, das einfach mit dem Assimilationsstrom weitergetragen wird. Dann sollte aber der Reiz nur sprossaufwärts wandern, jedenfalls viel schneller als in umgekehrter Richtung, da ja das Wasser überwiegend von der Wurzel in die Blätter wandert. Das stimmt aber nicht. Zudem konnte Snow[18] nachweisen, dass der Reiz schneller läuft als die Flüssigkeit in den Gefässen und dass bei dieser Wanderung regelrechte Aktionsströme abgenommen werden können. So wie sich jeder Pulsschlag unseres Herzens im Elektrokardiogramm aufzeichnen lässt, so kann man jede Bewegung der Mimose elektrisch registrieren.

Es könnte nun sein, dass der austretende Zellsaft einer gereizten Zelle selbst wieder Hormon mitbringt und damit die nächste Zelle zur Abgabe von Zellsaft veranlasst und dass auf diese Weise der Impuls von Zelle zu Zelle weitergegeben wird, unabhängig vom Flüssigkeitsstrom in den Gefässen. Die elektrischen Potentiale wären dann eine sekundäre Erscheinung, die auf der Ausbildung von Konzentrationsketten beruhen könnte. Es ist aber auch möglich, dass irgendein differenziertes Gewebe vorhanden ist, das in seiner Funktion mit den tierischen Nerven verglichen werden kann. Dies müsste dann den Reiz bis in die Gelenkpolster weitertragen und dort die Bildung oder Ausscheidung des Hormons veranlassen, das nun an Ort und Stelle die dazu vorgesehenen Zellen veranlasst, ihren Turgor zu vermindern. In diesem Fall wäre das Hormon dem Acetylcholin zu vergleichen und das oxydierende Ferment der Cholinesterase. Die Bewegung bei der Pflanze würde dann dem gleichen Plan folgen wie bei den Tieren, allerdings nach einem anderen chemischen Rezept.

Wir danken den Direktoren der botanischen Institute an den Universitäten Freiburg und Erlangen für die Anzucht der Versuchspflanzen und vielen freiwilligen Helfern, von denen hier nur Frau Helga Schildknecht genannt sei.

Summary

The irritation substances of various plants of the family of Mimosoideae are highly sensitive to oxygen, and their chemical behaviour is that of 'reductones'. Just the same substances were also found in non-sensitive plants. Meso-inositol is perhaps one of the original compounds leading to the active substances. It became possible to explain some characteristics of the irritation-process of *Mimosa pudica* by regarding known properties of reductones, i.e. the irritation reaction, the restitution, the influence of sun-light and their 'sleeping' in darkness.

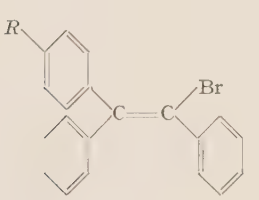
[16] H. v. Euler und C. Martius, Liebigs Ann. Chem. *505*, 73 (1933).
[17] H. v. Euler und M. L. Stein, Makromol. Chem. *15*, 60 (1955).
[18] R. Snow, Proc. roy. Soc., Lond. [B] *96*, 349 (1924).

Brèves communications - Kurze Mitteilungen
Brevi comunicazioni - Brief Reports

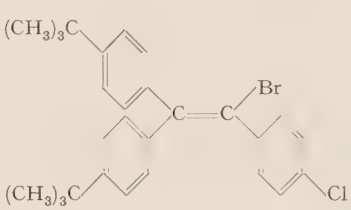
Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces communications. – Für die kurzen Mitteilungen ist ausschliesslich der Autor verantwortlich. – Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. – The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed by their correspondents.

Activité inhibitrice de certains α,β,β-triaryléthylènes vis-à-vis des sécrétions anté-hypophysaires

On sait qu'en plus de leurs propriétés spécifiques sur des organes récepteurs périphériques, les œstrogènes naturels ou synthétiques possèdent également une activité inhibitrice vis-à-vis du fonctionnement de l'anté-hypophyse (en particulier, inhibition de la sécrétion des hormones somatotrope, gonadotrope et corticotrope)[1]. Il était alors intéressant de rechercher des composés aussi peu actifs que possible sur les récepteurs périphériques (par exemple en ce qui concerne le développement de la mamelle, ou les modifications de l'épithélium vaginal exprimées par le test d'ALLEN et DOISY), et possédant néanmoins des propriétés inhibitrices notables vis-à-vis des sécrétions de l'anté-hypophyse.



(I)



(II)

La série des α,β,β-triaryléthylènes nous a paru favorable pour de telles recherches, les relations entre structure moléculaire et pouvoir œstrogène étant bien connues dans ce groupe[2]; en particulier, on sait que dans la molécule de l'α-bromo-α,β,β-triphényléthylène (I; R = H), la substitution en *para* par un radical hydrocarboné R fait décroître l'activité œstrogène d'autant plus fortement que ce radical est plus grand. Les quatre substances suivantes qui répondent à cette dernière condition, ont été choisies pour notre étude:

α-bromo-α,β-diphényl-β-(*p*-*n*-propylphényl)éthylène (I; $R = n\text{-}C_3H_7$),
α-bromo-α,β-diphényl-β-cumyléthylène (I; $R = iso\text{-}C_3H_7$),
α-bromo-α,β-diphényl-β-(*p*-*n*-butylphényl)éthylène (I; $R = n\text{-}C_4H_9$), et
α-bromo-α-*p*-chlorophényl-β,β-*bis*(*p*-*tert*.-butylphényl)-éthylène (II).

Deux groupes d'expériences ont été réalisés: l'un concernant les actions «centrales» (activités anti-somatotrophine, anti-F.S.H., anti-T.S.H., et anti-A.C.T.H.) et l'autre, concernant l'activité inhibitrice vis-à-vis des effets de l'hormone gonadotrope au niveau des ovaires.

a) *Dans les expériences du premier groupe*, des séries de 10 jeunes rats mâles pesant de 90 à 110 g reçoivent journellement par voie orale, pendant 3 semaines, le produit à étudier. Le tableau I résume les résultats obtenus, les chiffres correspondant à des moyennes.

b) *Dans un second groupe d'expériences*[3], des lots de 8 à 10 rats femelles de 21 jours ont été utilisés[4]. Les doses du produit à étudier (20 mg) sont administrées en 3 injections sous-cutanées (1 par jour); le jour suivant, les animaux (lot *G*) reçoivent une injection de 10 unités internationales de gonadotrophine sérique Roussel; on prend deux sortes de témoins: un lot (*T*) qui ne reçoit aucune injection, et un lot (*G*) ne recevant que de la gonadotrophine. Après 4 jours, on prélève les ovaires chez les animaux traités (lot *S*), l'inhibition de l'activité de la gonadotrophine, au niveau des récepteurs sexuels

[1] B. ZONDEK, Lancet *1936* I, 10. – R. L. NOBLE, J. Endocrin. *1*, 128, 216 (1939).
[2] J. M. ROBSON *et al.*, Nature *140*, 196 (1937). – A. LACASSAGNE *et al.*, Exper. *2*, 70 (1946).
[3] N. P. BUU-HOÏ, *Symposium international sur la Chimiothérapie du Cancer* (Oslo 1956), à paraître dans: Acta Un. int. Cancr.
[4] N. P. BUU-HOÏ, R. ROYER et N. D. XUONG, Bull. soc. chim. *1955* 1204 (1955). – N. D. XUONG et N. P. BUU-HOÏ, J. chem. Soc. *1952* 3741.

Tableau I

Formule du composé	Dose par jour (mg/kg d'animal)	Poids du corps g	Testicules		Surrénales		Thyroïde	
			g	g/100 g d'animal	mg	mg/100 g d'animal	mg	mg/100 g d'animal
I; $R = n\text{-}C_3H_7$	100	124	0,37	0,29	38,5	31,04	9,6	7,7
II	120	141	2,058	1,44	22	15,49	8,9	6,2
Témoins		143	1,993	1,38	22,5	15,83	9,6	6,6
I; $R = n\text{-}C_4H_9$	100	139	1,934	1,39	23,4	16,8	9,7	6,9
Témoins		160	2,265	1,40	22,6	14	10,2	6,3
I; $R = iso\text{-}C_3H_7$	250	142	1,85	1,30	20,3	14,2	10	7,04
Témoins		155	2,02	1,30	21,7	14	10,7	6,9

On voit qu'aux doses utilisées, le composé (I; $R = n\text{-}C_3H_7$) inhibe fortement la croissance corporelle, provoque une atrophie considérable des testicules et une hypertrophie importante des surrénales; le composé (I; $R = n\text{-}C_4H_9$) inhibe également la croissance corporelle, mais est très peu actif sur les testicules et les surrénales.

est mise en évidence par la pesée des ovaires. Le tableau suivant donne les résultats obtenus:

Tableau II

Formule du composé	Lots	Poids des 2 ovaires		Poids du corps (en g)	
		mg	mg/100 g d'animal	avant	après
II	*T*	11,6	19,3	42	59
	G	20,5	33,7	42	60
	S	19,2	31,9	42	59
I; $R = n$-C_3H_7 . . .	*T*	11,6	19,3	42	59
	G	20,5	33,7	42	60
	S	12,3	21,1	42	59
I; $R = iso$-C_3H_7 . .	*T*	12,0	19,5	43	62
	G	19,3	35,1	43	56
	S	13,9	26,2	41	52
I; $R = n$-C_4H_9 . . .	*T*	12,0	19,5	43	62
	G	19,3	35,1	43	56
	S	13,2	23,6	43	56

Ainsi, chez le rat, les composés (I; $R = n$-C_3H_7), (I; $R = iso$-C_3H_7), et (I; $R = n$-C_4H_9) possèdent une forte activité inhibitrice vis-à-vis de l'hormone gonadotrope au niveau des ovaires, le composé (II) étant peu actif de ce point de vue.

N. P. Buu-Hoï, N. D. Xuong et A. Beauvillain

Département de Chimie organique de l'Institut du Radium de l'Université de Paris, le 10 août 1956.

Summary

An investigation has been made of the inhibitory effects on the secretions of the anterior pituitary of four α,β,β-triarylethylenes with weak oestrogenic activity. These substances have been found to vary in the degree to which they inhibit each of the secretions investigated.

Kolorimetrische Bestimmung des Arginins mit Diazetylmonoxim*

Beim Nachweis von Carbamidoverbindungen mit Diazetyl arbeitete Wheatley[1] eine kolorimetrische Methode für die Bestimmung des Harnstoffs im Blut aus, in welcher der Harnstoff mit Diazetylmonoxim eine Farbreaktion gibt. Um die Intensität der Farbe zu vertiefen und von Gelb zu Magentarot zu bringen, fügt man zur Lösung N-Phenylanthranilsäure.

Um sicher zu sein, dass man diese kolorimetrische Reaktion auch in biologischen Flüssigkeiten anwenden kann, habe ich versucht, diese auf verschiedene Stoffe, die die Guanidingruppe enthalten (Guanidin, Methylguanidin, Dimethyl-guanidin, Arcain, Agmatin, Arginin, Guanidoessigsäure), und andere Stoffe mit ähnlicher Struktur (Citrullin, Ornithin, Kreatin, Kreatinin) anzuwenden, indem ich allen Beschreibungen von Wheatley folgte.

* Vorgelegt am XV. Internationalen Kongress für Analytische Chemie (Lissabon 1956).

[1] V. R. Wheatley, Biochem. J. *43*, 420 (1948).

Alle von mir untersuchten Stoffe, die die Guanidingruppe enthalten, geben eine sehr starke Reaktion.

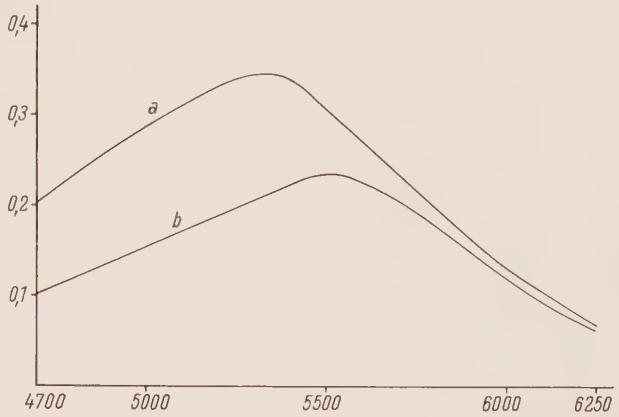


Abb. 1. Absorptionsspektra der Magentarot-Farbe: *a* Harnstoff; *b* Arginin. Abszisse: Wellenlänge; Ordinate: Extinktion.

Beim Analysieren des Absorptionsspektrums der entwickelten Farbe mit Harnstoff oder Arginin (Abb. 1) findet man, dass die Absorptionsmaxima verschieden sind. Für Harnstoff liegt das Maximum bei 5350, für Arginin bei 5500 Å.

Auf Grund dieses Unterschieds bestimmte ich die Absorptionsspektren von einigen biologischen Flüssigkeiten, wie zum Beispiel eiweissfreiem Blut und *Liquor cerebrospinalis* (Abb. 2).

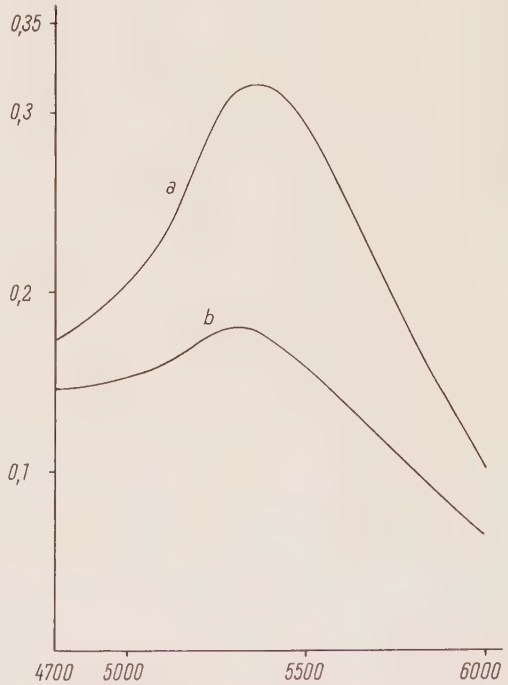


Abb. 2. Absorptionsspektra der Magentarot-Farbe: *a* eiweissfreies Blut, *b* *Liquor cerebrospinalis*. Abszisse: Wellenlänge; Ordinate: Extinktion.

Das Auftreten eines Absorptionsmaximums bei 5300 Å in beiden Spektren zeigt, dass in diesen Flüssigkeiten die bezüglichen Konzentrationen von Harnstoff und Substanzen mit einer Guanidingruppe derartig sind, dass man mit Sicherheit den Harnstoff quantitativ bestimmen kann, ohne vorher die Substanzen mit der Guanidingruppe entfernen zu müssen.

Weil diese Reaktion bei hoher Schwefelsäurekonzentration (zum Schluss 53%) ausgeführt wird und alle geprüften Aminosäuren ausser Arginin nicht mit Diazetylmonoxim reagieren, untersuchte ich, ob sich diese Reaktion zur quantitativen Bestimmung des Arginins in Eiweisskörpern eignet. Sie erwies sich für alle Eiweißstoffe in Lösung oder in Substanz brauchbar.

Die gefundenen Werte sind, zusammen mit Angaben der Literatur, in der Tabelle aufgeführt.

Konzentration des Arginins in verschiedenen Eiweißstoffen

	Arginin g%	
	Gefunden	Aus der Literatur[2]
Casein	4,7	4,1
Edestin	16,0	16,7
Ovalbumin	5,5	5,7
Glutenin	3,5	3,9–4,3
Gliadin	3,2	2,7

Nukleinsäuren und Polysaccharide, welche sich bei der Ausfällung der Proteine mit diesen abscheiden können, beeinträchtigen das Verfahren nicht. Es eignet sich dagegen nicht zur Bestimmung von freiem Arginin in harnstoffhaltigen Organflüssigkeiten.

R. Rendi

Institut für Allgemeine Physiologie, Rom, den 6. September 1956.

Summary

The colorimetric reaction with diacetilmonoxim, used for urea determination, is also positive for all those substances which have a guanidin group.

This reaction can be used also for the quantitative determination of arginin in the non-hydrolized proteins, both in solutions or on precipitates.

[2] H. Neurath und K. Bailey, *The Proteins*, vol. I, A (Academic Press, New York 1953). – R. J. Block und D. Bolling, *The Aminoacid Composition of Proteins and Foods* (C. C. Thomas, Springfield, Ill., 1951).

Zur Charakterisierung der Siebröhren-Kallose

Unter Kallose versteht der Histologe eine Gruppe von Membranstoffen pflanzlicher Zellwände, die Triphenylmethanfarbstoffe (zum Beispiel Anilinblau) selektiv speichern. Den Prototyp dieser Substanz bilden die Kalluspfropfen der Siebröhren, welche die Siebplatten verschliessen, wenn diese Leitbahnen ausser Funktion gesetzt werden. Ausserdem ist Kallose in den sogenannten Zystolithen sowie in Pollenschlauch- und Pilzmembranen gefunden worden[1]. Sowohl in Pilzkallose[2] als auch in Zystolithenkallose[3] kann nur Glukose als Hydrolyseprodukt nachgewiesen werden. Trotzdem unterscheiden sich die Eigenschaften der Kallose wesentlich von jenen der Zellulose, der Stärke oder des Glykogens. Besonders gross ist der Unterschied gegenüber Zellulose, denn die Kallose ist isotrop, mit Jod nicht färbbar und in Schweizer-Reagens unlöslich; dagegen löst sie sich in Eau de Javelle und verquillt sofort in konzentriertem Kalium- oder Kalium-Quecksilber-Jodid. Die Unlöslichkeit in Kupfertetramin und Kupferäthylendiamin spricht gegen die Existenz von Wasserstoffbindungen zwischen den Molekülen dieses Wandstoffes.

Die Siebröhrenkallose ist bisher noch keiner näheren Prüfung unterzogen worden, weil ihre Reindarstellung auf grosse Schwierigkeiten stösst. Es ist indessen cand. rer. nat. G. Kessler in seiner Diplomarbeit gelungen, 140 mg Kallose von befriedigendem Reinheitsgrad aus dem Phloem der Weinrebe zu isolieren. Die gewonnenen Kallosepfropfen sind einzelne oder miteinander verbundene Kügelchen von etwa 10 μ Durchmesser. Ihre Dichte beträgt etwa 1,62; sie entspricht also jener von Stärkekörnern (unter Wasser 1,60–1,63) und ist höher als die der Zellulose (1,55). Man darf daher annehmen, dass in der Kallose, wie bei der Stärke, kristallwasserartig gebundenes Hydratationswasser am Aufbau beteiligt ist.

Der Brechungsindex der Kallosepfropfen beträgt $1{,}532 \pm 0{,}002$. Er stimmt mit dem kleinen Brechungsindex der anisotropen Zellulose ($n\alpha - 1{,}532$, $n\gamma - 1{,}599$) überein und liegt wenig unter dem grossen Brechungsindex der Kartoffelstärkekörner ($n\alpha - 1{,}523$, $n\gamma - 1{,}535$).

Die hydrolysierte Siebröhrenkallose liefert auf dem Papierchromatogramm nur Glukose, in Übereinstimmung mit den Befunden bei Pilz- und Zystolithenkallose.

Bei der Vakuumtrocknung sintern die mikroskopischen Kalluskügelchen zu einer durchsichtigen, glasigen Masse zusammen, die an Pflanzengummi erinnert. Im Gegensatz zu den weissen, imbibierbaren Aerogelen der Stärkekörner und der Zellulosefasern liefert die Kallose wie verkleisterte Stärke ein verhorntes durchscheinendes Xerogel. Es ist daher zu untersuchen, ob, ähnlich wie im Amylopektin und im Glykogen, verzweigte Glukosanketten vorliegen, welche die Einordnung der Kallosemoleküle in ein Gitter und die Bildung von submikroskopischen Fibrillen erschweren oder verunmöglichen. Kleine Xerogelstückchen wurden daher der Röntgenanalyse unterworfen. Es zeigte sich dabei, dass sich die als Sediment gewonnene Kallose nicht quantitativ von den im *Vitis*-Phloem reichlich vorkommenden Kalziumoxalatkriställchen hatte abtrennen lassen. Indessen ist zu bemerken, dass die oben erwähnten Bestimmungen der Dichte und des Brechungsvermögens der Kallose nicht mit diesem Gel, sondern an den mikroskopischen Kalluskügelchen aus reiner Kallose gewonnen worden sind.

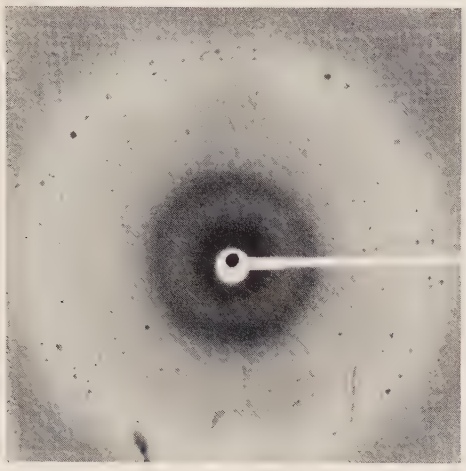
In der Röntgenkammer wurden Debye-Scherrer-Aufnahmen auf ebene Filme mit Cu-Kα-Strahlung (Ni-Filter) hergestellt, wobei der Film/Präparat-Abstand 100 bzw. 30 mm betrug. Dabei ergaben sich einige breite Ringe neben wenigen feinen, scharfgezeichneten Punkten. Vermittels einer normalen Debye-Scherrer-Aufnahme auf zylindrischem Film konnte nachgewiesen werden, dass die Punktinterferenzen von Kalziumoxalat-Monohydrat stammen. Die Ausmessung der breiten Ringe ergab die in der folgenden Tabelle zusammengestellten Werte:

Intensität	Ringbreite Å	Intensitätsmaximum Å
stark	16,3–14,2	etwa 15,5
s. schwach		etwa 12,3
mittel	5,3– 3,9	4,8
mittel-schwach		4,2
s. schwach		2,84

Die Abbildung zeigt die bei 100 mm Filmabstand gewonnene Aufnahme mit dem 15-Å-Ring sowie mit gegen

[1] L. Mangin, C. r. Acad. Sci. Paris *110*, 644 (1890).
[2] L. Mangin, C. r. Acad. Sci. Paris *151*, 279 (1910).
[3] W. Eschrich, Planta *44*, 532 (1954).

den Bildrand hin locker zerstreuten Punktinterferenzen des Kalziumoxalates.



Der 15-Å-Ring der Siebröhren-Kallose.

Die breite Bande bei etwa 15 Å deutet darauf hin, dass in der Kallose eine wichtige Strukturidentitätsperiode etwa 15 Å beträgt. Für den Fall, dass die Strukturaufklärung der Kallose zur Feststellung von β-1-4-glukosidischen Bindungen führen sollte, mag erwähnt werden, dass die Länge des Glukoserestes in gestreckten Glukosanketten dieses Bindungstypes 5,1 Å beträgt und eine ganze Familie von Zellulosederivaten mit Kettenperioden von 15,2 bis 15,4 Å aus drei Glukoseresten in trigyroidischer Anordnung bekannt ist[4].

A. Frey-Wyssling, W. Epprecht und G. Kessler

Institut für Allgemeine Botanik und Institut für Technische Physik der Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich, den 1. November 1956.

Summary

Callose of sieve plates from the phloem of *Vitis vinifera* is characterized by a high density of 1·62 and a refraction index of 1·532 $\pm$ 0·002. The X-ray diffraction pattern yields 5 diffuse rings, the strongest of which indicates a periodicity of 15·5 Å.

[4] J. Gundermann, Z. physikal. Chem. B *37*, 387 (1937).

L'incompatibilité dans *Oenothera Serrulata* Nutt.

Oenothera serrulata Nutt. (*Meriolix serrulata* Walp.)[1] est une espèce nordaméricaine[2]. Cette plante annuelle, très rameuse, au port buissonnant, à feuilles sessiles, étroites, dentées, est caractérisée par la fleur du type *Oenothera*, mais avec hypanthium évasé et stigmate discoïde. Les capsules sessiles sont linéaires.

Les semences prélevées au Texas[3] sur deux plantes, l'une à gorge de l'hypanthium jaune et à stigmate noir, l'autre à gorge noire et à stigmate noir, ont donné en culture des types nouveaux: individus à gorge rouge, et individus à stigmate jaune, en mélange avec les types parentaux. Le déterminisme génétique de cette pigmentation est à l'étude, ainsi que la variabilité de la taille des plantes (20 à 60 cm), celle des fleurs et de la morphologie des feuilles.

L'examen cytologique s'est montré difficile, le matériel est très délicat. Une fixation à l'alcool acétique (mélange 4–1) donne les meilleurs résultats (avec de l'alcool 70°), si on procède ensuite par étalement dans le carmin acétique pauvre en fer. En mitose somatique, 14 chromosomes ont été dénombrés. La méiose dans les cellules-mère de grains de pollen montre 7 bivalents dont la disjonction est régulière.

Le pollen est habituellement régulier, avec le type de grain trilobé qui caractérise le genre *Oenothera*.

L'autopollinisation plusieurs fois répétée pour chacune des 12 plantes constituant la population initiale en 1954, n'a donné que des résultats négatifs. Pourtant en fécondation libre ces plantes nouent régulièrement, développant des capsules remplies de graines, ce qui prouve que les ovules sont fonctionnels. Il y a donc autostérilité.

Tous les croisements possibles ont été réalisés: chaque plante pollinisée par toutes ses voisines. Le bilan général des opérations montre qu'il y a *soit interstérilité, soit interfertilité* avec résultats identiques pour les croisements réciproques.

Les graines fournies par les croisements positifs ont donné en 1955 des populations où l'autostérilité des descendants s'est trouvée confirmée. Parfois un faible développement parthénocarpique de l'ovaire suit immédiatement l'autopollinisation et peut donner l'illusion d'un résultat positif, mais ces ébauches de capsule ne tardent pas à tomber. Trois semaines après la pollinisation, on peut définir sans ambiguité un résultat comme positif ou négatif.

L'étude histologique des conditions de fécondation a été faite par l'observation des tubes polliniques dans le style. Les fleurs sont prélevées 24 h après autopollinisation; le tissu conducteur est extrait du style et étalé dans le bleu-coton au lactophénol. On voit alors que la croissance des tubes polliniques est inhibée dans la partie supérieure du style qui a en moyenne 2 cm de long. Cet arrêt de croissance n'est cependant pas localisé dans une zone déterminée, il est progressif: la grande masse des tubes polliniques est bloquée sous le stigmate, quelques tubes poursuivent leur développement et s'arrêtent à des niveaux variés; on en voit très rarement qui atteignent l'ovaire. Il y a seulement arrêt de développement, l'extrémité du tube pollinique inhibé est normale: on n'observe ni renflement en massue, ni éclatement. La même observation est faite sur des fleurs prélevées 40 h après autopollinisation.

Dans le cas de croisements à résultat positif, on voit que la grande masse des tubes polliniques a déjà traversé la base du style, 24 h après la pollinisation.

Ces observations permettent de caractériser la stérilité dans Oenothera serrulata, comme un phénomène d'Incompatibilité de fécondation.

Le mécanisme génétique dont relève ce phénomène d'Incompatibilité a pu être analysé par les résultats de

[1] J. Torrey et A. Gray, *Flora of North America* (New York 1840). – L. Britton et A. Brown, *Ill. Flora of the N.U.S., Can.* (New York 1947).

[2] R. E. Cleland, Indiana Univ. Publ. Sci. Ser. 16 (1950).

[3] Des graines récoltées dans la nature nous ont été obligeamment envoyées par M. le Prof. M. V. Brown (Austin).

croisements effectués à l'intérieur de chacune des populations de 1955. Dans chaque population les plantes peuvent être classées en 2 ou 4 groupes interfertiles, chacun des groupes étant constitué d'individus interstériles. Pour 10 populations, les résultats sont les suivants:

Population	I, 23 plantes	– 4 groupes:	10, 6, 4, 3 plantes
Population	II, 12 plantes	– 4 groupes:	5, 3, 2, 2 plantes
Population	III, 11 plantes	– 4 groupes:	6, 3, 1, 1 plantes
Population	IV, 9 plantes	– 4 groupes:	4, 3, 1, 1 plantes
Population	V, 7 plantes	– 4 groupes:	2, 2, 2, 1 plantes
Population	VI, 16 plantes	– 2 groupes:	9, 7 plantes
Population	VII, 10 plantes	– 2 groupes:	6, 4 plantes
Population	VIII, 9 plantes	– 2 groupes:	5, 4 plantes
Population	IX, 7 plantes	– 2 groupes:	4, 3 plantes
Population	X, 5 plantes	– 2 groupes:	4, 1 plantes

Ces premiers résultats montrent que le déterminisme génétique du phénomène d'Incompatibilité est du type *Nicotiana-Veronica:* allélie multiple au locus *S*, incapacité pour un pollen de traverser un style qui porte un allèle *S* identique au sien. De ce fait, chaque plante est hétérozygote pour les allèles *S*, et par le jeu de ces allèles d'opposition, une population à 4 groupes d'Incompatibilité est issue d'un croisement totalement compatible (ex.: $S_1 S_2 \times S_3 S_4$); une population à 2 groupes est issue d'un croisement demi-compatible, les parents ayant 1 allèle commun (ex.: $S_1 S_2 \times S_2 S_3$). Dans ce dernier cas l'un des groupes-fils a un génotype identique à celui du père, ce qui ne peut être vérifié pour *Oe. serrulata*, puisque c'est une espèce annuelle.

Les relations de compatibilité entre plantes appartenant aux différents groupes des 10 populations ont été établies dans une série spéciale d'opérations. Les résultats de ces opérations, superposés à ceux qui ont été obtenus entre les 12 plantes de la population de 1954, montrent que cette population initiale comportait 5 allèles différents, S_1 à S_5.

En conclusion, l'Incompatibilité se présente dans *Oenothera serrulata* Nutt., elle s'y manifeste avec les mêmes caractéristiques que chez *Oenothera organensis*, *Oe. missouriensis* et *Oe. fruticosa*[1], en remarquant que chez cette dernière espèce la polyploïdie rend le mécanisme factoriel plus compliqué.

R. Linder et J. Brun

Institut de Botanique de Strasbourg, France, le 17 septembre 1956.

Zusammenfassung

Bei *Oenothera serrulata* Nutt., einer diploïden Art ohne Katenation, wird Inkompatibilität (Selbststerilität) festgestellt. Aufgeklärt wird der Vererbungsmechanismus – eine Serie von Oppositionsallelen in einem Locus *S* –, welcher mit dem in der Gattung *Oenothera* schon bekannten identisch ist.

[4] R. Linder, Année biolog. *30*, 12, Bibliographie (1954).

Die Bedeutung der Mitochondrienstruktur für die Zitronensäuresynthese

Bekanntlich besteht ein Zusammenhang zwischen Struktur und Stoffwechsel der Mitochondrien. Unter den enzymatischen Prozessen sind es vor allem oxydative Reaktionen von meist komplexer Natur, die eine strukturelle Integrität voraussetzen. In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass eine strenge Strukturabhängigkeit auch bei einer einstufigen Reaktion bestehen kann, welche von einem in kristallisierter Form erhältlichen und in löslichen Systemen aktiven Enzym katalysiert wird.

Die Synthese der Zitronensäure aus Azetyl-CoA mittels kondensierendem Enzym ist nach den Untersuchungen von Ochoa[1] ein Vorgang, der an und für sich keine höhere strukturelle Organisation beansprucht. Wurde diese Synthese dagegen an Mitochondrien untersucht, so erwies sie sich als strukturabhängig. Schädigung der Mitochondrienstruktur durch hypotonische oder isotonische Inkubationslösung führte zu einer Verminderung der synthetischen Aktivität (Tabelle I).

Tabelle I

Reaktionsgemisch: 50 μM Phosphatpuffer, pH 7,4; 5 μM $MgSO_4$; 3 μM KCN; 60 μM Oxalazetat; Azetyl-CoA, wie angegeben. Mitochondrienmenge: 2,4 mg Eiweiss. Gesamtvolumen 2,0 m. Reaktionsdauer 10 min. Temperatur 37°C. Bestimmung der Zitronensäure nach Natelson, Pincus und Lugovoy[2].

Vorbehandlung des Mitochondrienpräparates	μM Synthetisierte Zitronensäure	
	mit 0,5 μM Azetyl-CoA	mit 5,2 μM Azetyl-CoA
Nativ	0,55	1,43
Isotonisch inkubiert (23 min, 37°C) .	0,35	1,71
Hypotonisch inkubiert (23 min, 37°C)	0,33	1,76

Die Hemmwirkung konnte nur nachgewiesen werden, wenn das Substrat, Azetyl-CoA, in suboptimaler Menge vorhanden war. Der Grad der Hemmung nahm mit steigender Substratkonzentration ab (Tabelle II) und wurde in Gegenwart eines grossen Azetyl-CoA-Überschusses völlig aufgehoben (Tabelle I). (In manchen Fällen konnte sogar eine Steigerung der Synthese beobachtet werden, wahrscheinlich als Folge der verbesserten Permeabilitätsverhältnisse.)

Tabelle II

Reaktionsgemisch: 120 μM Phosphatpuffer, pH 7,4; 30 μM Fluorazetat; 5 μM $MgSO_4$; 60 μM Oxalazetat; Azetyl-CoA, wie angegeben. Mitochondrienmenge: 3,3 mg Eiweiss. Volumen 2,05 ml. Reaktionsdauer 10 min. Temperatur 37°C. Die Schädigung der Struktur erfolgte durch hypotonische Inkubationslösung.

Substratkonzentration μM/Reaktionsgemisch	Hemmung der Zitratsynthese %
0,88	54,2
1,76	48,2
3,52	20,8
5,28	0

Dies beweist, dass trotz der Schädigung der Mitochondrienstruktur das kondensierende Ferment nicht inaktiviert wird, der Eingriff also nicht direkt am En-

[1] J. R. Stern und S. Ochoa, J. biol. Chem. *191*, 161 (1951). – S. Ochoa, J. R. Stern und M. C. Schneider, J. biol. Chem. *193*, 691 (1951).

[2] S. Natelson, J. B. Pincus und J. K. Lugovoy, J. biol. Chem. *175*, 745 (1948).

zym erfolgt. Zur Sättigung ist aber bei zerstörten Mitochondrien eine viel höhere Azetyl-CoA-Konzentration notwendig als bei nativen. Unter Berücksichtigung unserer früheren Untersuchungen, die zeigten, dass die Azetyl-CoA-Deazylase der Mitochondrien bei Strukturschädigung aktiviert wird[3], können die besprochenen Resultate als Folge einer Wechselwirkung beider Enzyme gedeutet werden. Die vermehrte Hydrolyse von Azetyl-CoA ergibt indirekt eine Verminderung der Zitratsynthese.

Bei normalem Ablauf der Stoffwechselprozesse wird das entstehende Azetyl-CoA ständig verbraucht, so dass seine aktuelle Konzentration stets niedrig bleibt. Deshalb wurde die Zitratsynthese auch von Azetat ausgehend untersucht, wobei dem kondensierenden Enzym nur das durch Azetataktivierung laufend produzierte Azetyl-CoA zur Verfügung steht. In diesen Versuchen konnte eine noch ausgeprägtere Strukturempfindlichkeit beobachtet werden.

Tabelle III

Reaktionsgemisch: 50 μM Phosphatpuffer, pH 7,4; 30 μM Fluorazetat; 5 μM $MgSO_4$; 20 μM Natriumazetat; 30 μM Oxalazetat; 7 μM ATP. Menge der Mitochondrien in den einzelnen Versuchen von 3,8 bis 6 mg Eiweiss. Reaktionsdauer 10 min. Temperatur 37°C. Gesamtvolumen 2,1 ml.

Vorbehandlung des Mitochondrienpräparates	Synthetisierte Zitronensäure μM
1. Nativ	1,60
Isotonisch inkubiert (20 min, 37°C)	0,49
2. Nativ	1,27
Hypotonisch inkubiert (20 min, 37°C)	0,19
3. Nativ	0,87
Aus hypotonischem Homogenat präpariert	0,28

Dabei konnte die Hemmung durch höhere Konzentrationen der an der Reaktion beteiligten Substrate und Coenzyme aufgehoben werden. Bekanntlich ist die Azetataktivierung ein Prozess, der auch in löslichen Systemen vor sich gehen kann[4]; somit ist diese grosse Strukturempfindlichkeit eher der stets sehr kleinen Substratkonzentration als einer direkten, spezifischen Hemmung der Aktivierung zuzuschreiben.

Daraus geht hervor, dass in der Zelle, wo diese Reaktionen an den Mitochondrien ablaufen[5], infolge einer enzymatischen Wechselwirkung auch scheinbar strukturunabhängige Prozesse auf strukturelle Veränderungen reagieren können.

Maria Székely

Biochemisches Institut der Medizinischen Universität, Budapest, den 3. August 1956.

Summary

Rat liver mitochondria proved to need a structural integrity for optimal citric acid synthesis. Structural impairment leads to an inhibition of the synthetic activity of the mitochondria, the degree of inhibition being inversely related to substrate concentration; it causes, however, no inactivation of the condensing enzyme. The dependence of this reaction upon the structural conditions is the consequence of an interaction between the two mitochondrial enzymes acetyl-CoA deacylase and condensing enzyme.

[3] M. Székely, Acta physiol. Acad. Sci. Hung. *8*, 291 (1955).
[4] T. C. Chou und F. Lipmann, J. biol. Chem. *196*, 89 (1952).
[5] G. Kalnitsky, J. biol. Chem. *179*, 1015 (1949).

Mitosenverteilung in der larvalen Rumpfepidermis von *Salamandra maculosa* Laur.

Ein sicheres Mass für die zeitliche Abgrenzung eines Regenerationsvorganges bietet unter anderem die Erhöhung der mitotischen Aktivität in dem von der Regeneration betroffenen Bereich gegenüber einem normalen, das heisst unverletzten Bezugssystem. Dabei geht man von der als selbstverständlich geltenden Grundbedingung aus, dass sich die beiden zu vergleichenden Systeme der Kontrolle und des Versuchs im Verlauf einer ungestörten Entwicklung bezüglich ihrer Zellzahl und Teilungsrate gleichartig verhalten. So setzen zum Beispiel auch Hadorn und Chen[1] in ihren Untersuchungen an *Triton-alpestris*-Larven über die Wanderung und die Frage einer erhöhten Teilungsrate der Leydigschen Zellen voraus, dass beim unverletzten Kontrolltier in der Rumpfregion die Anzahl der Epidermiszellen beider Körperhälften annähernd gleich ist.

Eigene Untersuchungen, die sich unter anderem auch mit der erhöhten mitotischen Aktivität nach Wundsetzung befassten, gaben Veranlassung, die Mitosenverteilung in der Rumpfepidermis unverletzter Salamanderlarven im Hinblick auf folgende Fragen zu prüfen:

Wie verteilen sich die Mitosen der Rumpfepidermis
a) in cranio-caudaler,
b) in dorso-ventraler Richtung?

Für die Versuche wurden Salamanderlarven im Alter von 14 bis 21 Tagen verwandt, die bis zur Fixierung unter konstanten Bedingungen (Wassertemperatur 17°C, tägliche Fütterung) gehalten wurden.

In einer ersten Serie wurden an 6 Tieren die Mitosen der Rumpfepidermis jeweils an einer Schnittfolge von 450 bis 600 Querschnitten an jedem 6. Schnitt ausgezählt. Das entspricht bei einer Schnittdicke von 10 μ einem ausgewerteten Rumpfbereich von 4,5 bis 6,0 mm. Dabei wurden alle Mitosestadien von der völligen Auflösung der Kernmembran bis zur späten Telophase in die Zählung einbezogen.

Wie die in Tabelle I zusammengefassten Resultate zeigen, ist auf einem Rumpfbereich von 4,5 bis 6,0 mm die Anzahl der beiderseits in Teilung befindlichen Leydigschen- und Epithelzellen annähernd gleich. Dasselbe gilt auch für die Ruhekerne beider Körperhälften.

In einer abgeänderten Versuchsanordnung wurde an einer zweiten Serie von 5 Tieren der Rumpfbereich in 10 μ dicke Frontalschnitte zerlegt und an diesen die Mitosen in der die Muskelsegmente bedeckenden Epidermis getrennt nach Seite und Segment ausgezählt. Im mikroskopischen Bild lassen sich die einzelnen Segmente durch den Verlauf der Septen sowie durch eine leichte Wölbung ihrer Oberfläche deutlich voneinander unterscheiden.

Das Ergebnis der Auszählung ist aus Tabelle II zu ersehen: Die senkrecht untereinander stehenden Zahlen

[1] E. Hadorn and P. S. Chen, Roux' Arch. Entw.-Mech. *146*, 515 (1953).

Tabelle I. — Verteilung von Mitosen und Ruhekernen auf beiden Körperhälften (cranio-caudal).

Tier Nr.	Anzahl der Mitosen in Epithelzellen links	Epithelzellen rechts	Leydigschen Zellen links	Leydigschen Zellen rechts	Gesamtzahl der Mitosen links	Gesamtzahl der Mitosen rechts	Ruhekerne links	Ruhekerne rechts	Anzahl der ausgezählten Schnitte
1	272	239	142	155	414	394	42 200	41 900	80
2	579	570	14	16	593	586	64 000	64 000	80
3	260	274	95	89	355	363	33 000	33 000	80
4	831	830	20	16	851	846	80 900	79 200	90
5	303	288	98	101	401	389	31 500	31 400	90
6	1029	1007	63	64	1092	1081	80 900	79 200	100

Tabelle II. — Segmentale Verteilung der Mitosen auf beiden Körperhälften.

Nr. Segment	1. links	1. rechts	2. links	2. rechts	3. links	3. rechts	4. links	4. rechts	5. links	5. rechts
1	*106*	78	12	*15*	13	*25*	83	*109*	*47*	33
2	75	*108*	*16*	13	*39*	27	*91*	70	26	*43*
3	*104*	76	18	*22*	19	*41*	94	*111*	*46*	31
4	65	*102*	*15*	11	*38*	34	*117*	89	28	*46*
5	*108*	79	16	*24*	36	*41*	95	*104*	*50*	37
6	83	*95*	*26*	11	*50*	24	*91*	78	29	*39*
7	*109*	98	11	*23*	23	*27*	95	*91*	*49*	39
8	79	*127*	*26*	12	*42*	36	*108*	97	23	*38*
9	*112*	99	12	*19*	21	*26*	86	*97*	*40*	25
10			*23*	21	*28*	*22*	*70*	58	23	*33*
11			9	*19*	15	*27*	44	*69*	*27*	18
12							*47*	42	23	*26*
Summe	1011	1035	184	190	326	340	1021	1015	411	408

Tabelle III. — Dorso-ventrale Verteilung von Mitosen und Ruhekernen auf beiden Körperhälften.

Tier Nr.	*a* Mitosen pro Ausschnitt DL	VL	VR	DR	*b* Gesamtzahl links	rechts	*c* Ruhekerne pro Schnitt DL	VL	VR	DR	Anzahl der ausgezählten Schnitte
1	242 (39%)	384 (61%)	360 (60%)	238 (40%)	626	598	277	270	273	273	80
2	240 (40%)	353 (60%)	341 (58%)	245 (42%)	593	586	301	308	295	317	80
3	146 (35%)	268 (65%)	246 (63%)	148 (37%)	414	394	266	270	260	262	80
4	146 (41%)	209 (59%)	227 (62%)	136 (38%)	355	363	245	225	242	228	80
5	168 (42%)	233 (58%)	225 (58%)	164 (42%)	401	389	314	306	309	310	90
6	459 (42%)	633 (58%)	612 (57%)	469 (43%)	1092	1081	394	394	390	400	100
7	343 (40%)	508 (60%)	522 (62%)	324 (38%)	851	846	443	456	450	435	90

entsprechen der Gesamtmitosenzahl jeweils einer rechten bzw. linken Segmenthälfte, in fortlaufender Reihenfolge der Metameren. Auch hier ist wieder, wie beim vorigen Versuch, die Gesamtmitosenzahl der rechten und linken Körperhälfte ungefähr gleich. Stellt man jedoch die Mitosenzahlen der einander entsprechenden rechten und linken Segmenthälften einander gegenüber, so ergeben sich in fast allen Fällen Unterschiede zwischen den Zahlen der rechten und linken Seite des Segments, die zum Teil 50% und mehr betragen. (In der Tabelle ist jeweils die grössere Zahl eines Zahlenpaares in kursiv.) Abgesehen von der zahlenmässigen Differenz zwischen den Segmenthälften fällt hier vor allen Dingen der Wechsel der einseitig gesteigerten mitotischen Aktivität von einer zur anderen Seite auf, der in den dargelegten Versuchen bis auf eine Ausnahme (Tier Nr. 4, Segment 7) regelmässig auftritt.

Zur Untersuchung der Frage der Mitosenhäufigkeit im dorsalen bzw. ventralen Bereich des Rumpfes wurde bei der Auswertung jeder Rumpfquerschnitt in 4 gleich grosse Teile unterteilt (Abb. 1): Zwei dorsale, DR und DL, und zwei ventrale, VR und VL. Die Mitosenzahlen für diese Sektoren an 80 bis 100 ausgezählten Schnitten jeweils eines Tieres sind in Tabelle III zusammengefasst. Darin entsprechen die in Kolonne *a* unter DL, VL, VR und DR stehenden Zahlen der Anzahl der auf diese 4 Sektoren entfallenden Mitosen. In Klammern ist ihr Anteil an der Gesamtmitosenzahl einer Körperhälfte in Prozent angegeben. Beim Vergleich dieser Zahlen ergibt sich, dass auf die dorsalen Sektoren durchschnittlich nicht mehr als 40% der Gesamtmitosenzahl der entsprechenden Körperhälfte entfallen. Die Prozentzahlen gewinnen an Bedeutung, wenn man die Ruhekernzahlen der einzelnen Sektoren (Kolonne *c*) mit in Betracht zieht und dabei feststellt, dass trotz der unterschiedlichen Verteilung der Mitosen auf die dorsale und ventrale Körperhälfte in allen 4 Bereichen deren durchschnittliche Ruhekernzahl pro Schnitt annähernd gleich ist.

Die gegenüber dem dorsalen Rumpfbereich erhöhte Zellteilungsrate im ventralen Abschnitt mag durch ein vielleicht positiv allometrisches Wachstum des Darmes und

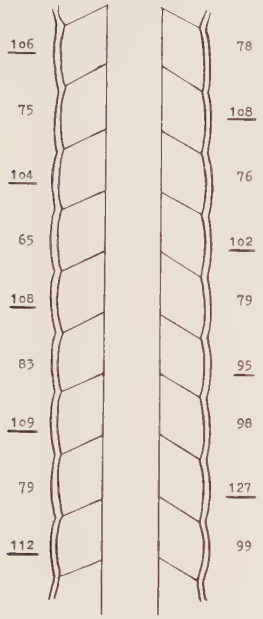


Abb. 1. Schematische Darstellung eines Frontalschnittes. Die Zahlen geben jeweils die Gesamtmitosenzahl pro Segment an (vgl. Tab. II, Nr.1).

der Leber erklärt werden. Daraus würde sich ja für die hypaxonische Muskulatur und die darübergelegene Epidermis die Notwendigkeit einer gegenüber dem dorsalen Rumpfbereich gesteigerten Teilungsrate ergeben.

Abb. 2. Auszählungsschema. Rumpfquerschnitt mit den beiden dorsalen (DL, DR) und ventralen (VL, VR) Sektoren.

Auf Grund der vorliegenden Ergebnisse lassen sich also die anfangs gestellten Fragen folgendermassen beantworten:

a) Die *Teilungsrate* der Epidermis beider Rumpfhälften ist bei Berücksichtigung des *gesamten Rumpfbereiches* annähernd gleich. Im Hinblick auf die *Einzelsegmente* in ihrer Aufeinanderfolge zeigt sich eine *regelmässige und wechselseitig* auftretende *Erhöhung der Mitosenrate.*

b) Von der Gesamtzahl der in der Rumpfepidermis auftretenden Mitosen entfallen durchschnittlich 40% auf die dorsale und dementsprechend etwa 60% auf die ventrale Körperhälfte.

Die Zahl der Ruhekerne ist für beide Abschnitte ungefähr gleich hoch.

Damit ist zunächst die zu Anfang geforderte theoretische Annahme eines gleichartigen Teilungsverhaltens zweier paramerer Systeme – in diesem Falle der beiden Rumpfhälften – durch eine zahlenmässige Erfassung bewiesen. Darüber hinaus gewähren die Befunde einen detaillierten Einblick in Wachstumsvorgänge, die aber erst durch umfangreicheres Material einer Klärung nähergebracht werden können.

In diesem Zusammenhang sei darauf hingewiesen, dass Stärk[2] bei der Gonadenentwicklung von Triton ein Alternieren der beiden Körperhälften hinsichtlich des Entwicklungstempos feststellen konnte.

Die überraschende Erscheinung einer in Abhängigkeit von der Metamerie auftretenden unterschiedlichen Teilungsintensität der Epidermis bietet einen Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen, die sich sowohl auf die Normalentwicklung als auch auf den Verlauf regenerativer Vorgänge erstrecken sollen.

O. Kuhn und W. Weber

Zoologisches Institut der Universität Köln, den 15. September 1956.

Summary

In the larval epidermal trunk region of *Salamandra maculosa*, the total number of mitoses of both sides is approximately the same. This applies to the differentiated Leydig cells as well as to the rest of the epidermis cells.

With respect to the meristic segmentation of the trunk, we find within the single segments a regular rise of the mitotic rate, which alternates from one side to the other.

From the total number of mitoses found in the epidermis of the trunk, approximately 40% can be accounted for to the dorsal and 60% to the ventral region of the trunk. The number of cells is the same for both the ventral and dorsal region.

[2] O. J. Stärk, Z. Zellforsch. *41*, 285 (1955).

The Effect of Whole Body Röntgen Irradiation on the Megakaryocytic System in Rat Femur

During maturation the megakaryocytes, precursors of the blood platelets, divide by endomitosis, i.e. the nuclear divisions are not followed by corresponding separation of the cytoplasmic mass. Consequently, the megakaryocytes continuously increase in size throughout maturation. In unstained preparations of bone marrow those cells of the megakaryocytic system which have reached a diameter of about 24 to 60 μ can readily be distinguished from other cell systems present.

In previous work[1] it was found that from the femur of young albino rats, which contains no fatty marrow, could be prepared a homogenous suspension of haemopoietic tissue in 1 ml of a solution of 5% sodium citrate

[1] J. Zajicek, Exper. *12*, 226 (1956).

(1 part) and 0·7% sodium chloride (4 parts). As megakaryocytes can be seen in the Bürker counting chamber, the total femoral content can thus be determined.

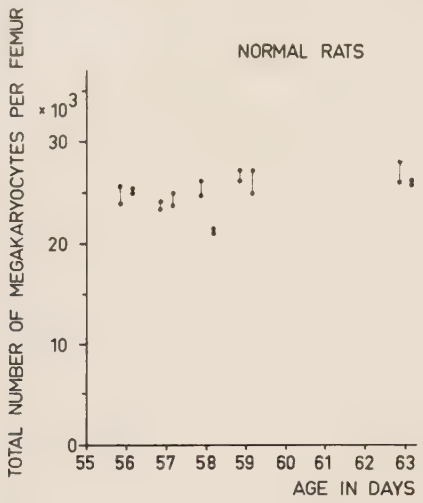


Fig. 1.—The femoral content of megakaryocytes in 10 albino rats from one litter. The values represent the counts in the left and in the right femur of each rat. Each femur contained about 25000 megakaryocytes.

The present study concerns the effect of whole body irradiation on the megakaryocytic system of young albino rats, as reflected in the femoral content of megakaryocytes on the first 7 days after irradiation.

Figure 1 shows the femoral megakaryocyte content in each of 10 albino rats from one litter, expressed as the mean of the counts in the left and in the right femur. Each femur contained about 25,000 megakaryocytes. The variations between the rats in this respect were very small.

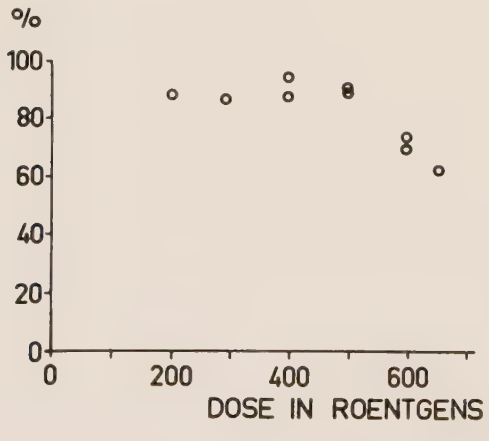


Fig. 2.—Femoral megakaryocyte counts 24 h after irradiation. Only the rats given 600 r or more showed markedly reduced counts.

In the irradiation experiments 2 or 3 rats from each litter were used as controls. The mean femoral count of megakaryocytes in these rats was plotted as 100%. The other rats of the litters were irradiated. Irradiation was performed with a General Electric 'Maximar' roentgen unit, with a radiation quality corresponding to 370 kVp (half-value layer 1·8 mm Cu). The dose-rate was about 50 r/min.

Figure 2 shows that 24 h after irradiation only those rats which have received 600 r or more had markedly reduced megakaryocyte counts. On the following day this reduction was also noted in the rats given 200 r or more (Figure 3). The reaction registered 48 h after ir-

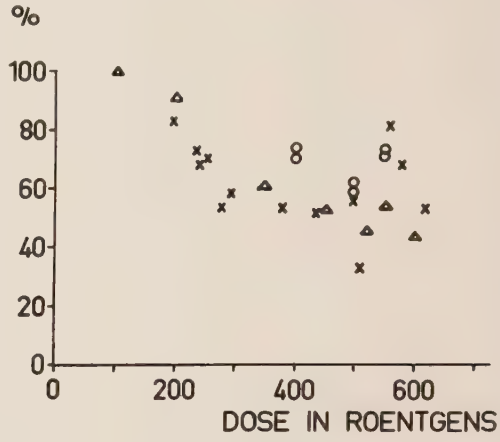


Fig. 3.—Femoral megakaryocyte counts 48 h after irradiation. Four litters were studied. (Crosses indicate two litters in which the non-irradiated controls showed practically identical megakaryocyte counts.)

radiation varied greatly between rats of different litters as well as between rats of the same litter. On the third and fourth postirradiation days the number of mega karyocytes continued to diminish, and by the fifth day a clear picture of the effect of whole body irradiation on the megakaryocytic system was obtained (Figure 4, crosses and triangles). A dose of only about 100 r markedly reduced the femoral megakaryocyte count. About 200 r effected a reduction of roughly 80%. Essentially

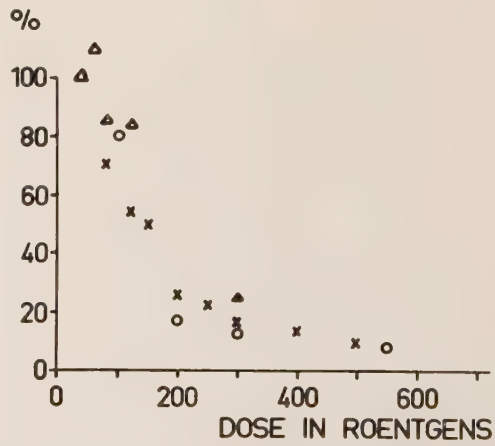


Fig. 4.—Femoral megakaryocyte counts on the 5th (crosses and triangles) and 7th (open circles) postirradiation days.

similar results were recorded on the seventh day after irradiation (Open circles in Figure 4).

Bo Lindell and J. Zajicek

Institute of Radiophysics and Institute of Radiopathology, Stockholm, Sweden, April 30, 1956.

Zusammenfassung

Das hämopoietische Gewebe des Femurs junger Albinoratten wurde in einer Lösung, die 5% Na-Zitrat (1 Teil) und 0,7% Na-Chlorid (4 Teile) enthielt, suspendiert. Die Megakaryozyten, deren Durchmesser 24 μ überschritt, wurden in einer Bürker-Kammer gezählt. Der Effekt der Ganzkörperbestrahlung auf das Megakaryozytensystem wurde untersucht durch Festlegung des femoralen Megakaryozytengehaltes während den ersten 7 Tagen nach der Bestrahlung.

Amebacidal Action of Cycloserine

D-4-amino-3-isoxazolidone (oxamycin, seromycin, cycloserine) is a broadspectrum antibiotic[1]. The present report describes the potent amebacidal activity of cycloserine against *Endamoeba histolytica in vitro* tested in the absence of bacteria.

The assay of cycloserine activity was conducted in a medium described earlier[2]. Three strains (NRS, UC, HUS-100) of *E. histolytica* were employed in these studies. Cycloserine was amebacidal (100% kill) in concentrations of 10 γ/ml ($^1/_{100\,000}$) and amebastatic (50% inhibition) in concentrations of 1 γ/ml ($^1/_{1\,000\,000}$). The inhibitory effects of cycloserine were partially reversed by adenine and guanine and completely reversed by adenosine, guanosine, adenylic acid, guanylic acid, and 2,6-diaminopurine. Folic acid, leucovorin, methionine, serine, 4-amino-5-imidazole-carboxamide, and pyrimidines were ineffective in reversing the amebacidal activity of cycloserine. When cycloserine was tested in ameba cultures containing associated bacteria, the amebacidal level was 1 mg/ml ($^1/_{1000}$). This suggests that the products of bacterial metabolism contained metabolite(s) which could reverse the toxic action of cycloserine.

It appears that in *E. histolytica*, cycloserine exhibits its inhibitory activity by preventing the incorporation of purines, nucleosides, or nucleotides into amebic nucleic acids. On the other hand, it does not seem likely that the site of cycloserine activity is at the level of utilization of the acyclic purine compounds and the 'one-carbon' transport system since 4-amino-5-imidazolecarboxamide, folic acid, and leucovorin were unable to release this inhibition. Cycloserine probably is without effect on the incorporation of pyrimidines since cytosine, uracil, and thymine were unable to reverse cycloserine activity.

Mitsuru Nakamura

Department of Microbiology, Boston University School of Medicine, Boston, Massachusetts, September 7, 1956.

Zusammenfassung

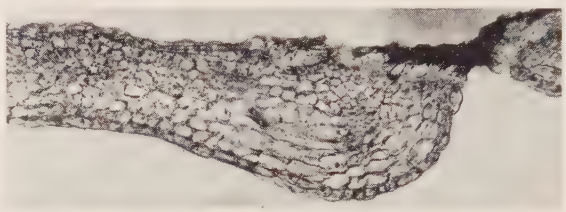
Endamoeba histolytica wird durch Cycloserin abgetötet. Diese amöbizide Wirkung wird durch Adenin und Guanin teilweise verhindert und durch Adenosin, Guanosin, Adenylsäure, Guanylsäure und 2,6-Diaminopurin vollständig aufgehoben.

[1] D. A. Harris, M. Ruger, M. A. Reagan, F. J. Wolf, R. L. Peck, H. Wallick, and H. B. Woodruff, Antibiotics and Chemotherapy *5*, 183 (1955). – A. C. Cuckler, B. M. Frost, L. McClelland, and M. Solotorovsky, Antibiotics and Chemotherapy *5*, 191 (1955). – H. Welch, L. E. Putnam, and W. A. Randall, Antibiotic Med. *1*, 72 (1955).

[2] M. Nakamura, Proc. Soc. exp. Biol. Med. *89*, 680 (1955).

Untersuchungen über die Bildung der Reblaus-Blattgalle

Für die Untersuchung der Cecidogenese haben sich die Reblaus (*Viteus* [*Phylloxera*] *vitifolii* Shimer) und die von ihr am Blatt der Rebe (*Vitis*) verursachte Beutelgalle als günstige Objekte erwiesen, weil es hierbei methodisch möglich ist, das galleninduzierende Sekret, das die Gallenlaus normalerweise in das Blattgewebe injiziert, zu sammeln und experimentell auf die Wirtspflanze zu übertragen[1]. Hier soll nun zunächst über die morphologischen und histologischen Veränderungen, die der experimentell applizierte Reblausspeichel an geeigneten Blättern bestimmter Rebsorten verursacht, berichtet werden.



Schnitt durch die linke Hälfte einer durch Reblausspeichel experimentell induzierten « Rudimentärgalle».

Wenige Tage nach der Speichelapplikation erkennt man – ganz in Übereinstimmung mit der ersten sichtbaren Reaktion des Blattes nach natürlichem Anstich durch die Reblaus – eine Anschwellung und Einsenkung des behandelten Blattgewebes. Gleichzeitig konzentriert sich hier die Blattnervatur, womit eine Aufhellung des Gewebes einhergeht. Die weitere Entwicklung derartig behandelter Blattareale führte dann allerdings in den bisherigen Versuchen lediglich bis zu sogenannten Rudimentärgallen (Abbildung), das heisst Zwerggallen, die auch natürlicherweise vorkommen und deren Entwicklung aus irgendeinem Grunde in einem frühen Stadium unterbrochen wurde. Vollausgebildete Gallen konnten auf diese Weise bisher noch nicht erzielt werden, was sicherlich damit zusammenhängen dürfte, dass eine ganze Reihe weiterer Voraussetzungen hiezu (adäquate Dosierung des Sekretes; kontinuierliche oder auch rhythmische Speichelapplikation in ganz bestimmten Entwicklungsphasen des Blattes, usw.) im Experiment vorerst nicht erfüllt werden können. Aus dem gleichen Grunde ist es auch nicht leicht, diese Versuche mit stets gleichbleibendem Erfolg zu reproduzieren.

Bei der histologischen Untersuchung derartiger experimentell induzierter Rudimentärgallen fällt unter anderem vor allen Dingen die Hypertrophie der Zellen auf, die auch für die natürliche Reblausgalle charakteristisch ist. Die Chloroplasten sind weitgehend degeneriert.

Da bisher in keinem Falle prinzipielle, sondern lediglich graduelle Unterschiede zwischen den experimentell induzierten Rudimentärgallen und echten Reblausgallen festgestellt werden konnten, darf wohl als sicher angenommen werden, dass allein der Reblausspeichel – adäquate Applikationen vorausgesetzt – die Gallenbildung bedingt und dass weitere, mögliche Gallenbildungsreize – etwa solche mechanischer Art – nur eine untergeordnete Rolle spielen.

[1] F. Anders, Verh. dtsch. Zool., Erlangen *1955*, 421.

Mitotische und endomitoseähnliche Teilungsstadien an vier durch Reblausspeichel gereizten Stellen eines jungen Blattes von *Vitis Rupestris* St. Georges.

Anzahl Kerne	Interphasen		Teilungsstadien					
			mitotische und endomitotische		mitotische Anaphasen		Endoanaphasen	
	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
1711	1690	98,8	21	1,2	4	0,2	2	0,1
1761	1710	97,1	51	2,9	6	0,3	14	0,8
1941	1890	97,4	51	2,6	4	0,2	19	1,2
1727	1675	97,0	52	3,0	13	0,7	5	0,3

Naturgemäss werfen nun diese Versuche und Beobachtungen die Frage nach der biologischen Wirkung des Reblausspeichels auf. Hier hatte die Feststellung, dass die Zellkerne des Gallengewebes mehreren Grössentypen angehören, bereits zu der Vermutung geführt, dass diese polyploid sind und dass der Reblausspeichel endomitotische oder doch wenigstens endomitoseähnliche Vorgänge verursacht[2]. Dem direkten Nachweis dieser Polyploidisierungsvorgänge stellten sich jedoch zunächst erhebliche Schwierigkeiten entgegen, da diese bei der Reblausgalle – genau so wie bei vielen anderen Objekten[3] – im allgemeinen maskiert verlaufen und nur durch schwierige Analysen der Kernstrukturen sicher erfasst werden können.

Trotzdem findet man jedoch unter bestimmten Bedingungen (Gewächshaus, Rebsorte) während der ersten Entwicklungsstadien einer Galle Kernbilder, die auf die Polyploidisierungsvorgänge selbst hindeuten. Die Metaphasechromosomen erscheinen – abweichend von der für Angiospermen charakteristischen Endomitose – kontrahiert, oft sogar überkontrahiert, und rücken – gewöhnlich der Kernmembran anliegend – in der Anaphase auseinander, ohne dass sich die Tochterpaare vollkommen trennen. Im ganzen erinnert dieser Vorgang einerseits an die für manche tierische Objekte charakteristische Endomitose mit kontrahierten Metaphasechromosomen, andererseits aber an eine Stathmokinese mit darauffolgender Restitutionskernbildung.

Allerdings ist durch die Beobachtung dieser endomitoseähnlichen Vorgänge allein noch nicht erwiesen, dass diese primär durch den stofflichen Reiz der Reblaus verursacht werden. Sie könnten vielmehr auch als Folgeerscheinung der bereits in Gang befindlichen, morphologisch und histologisch feststellbaren Gallenbildung aufgefasst werden. Um diese für die Kausalanalyse der Gallenbildung entscheidende Frage zu bearbeiten, wurde junges, reaktionsfähiges Blattgewebe dem Gallenreiz ausgesetzt und einige Stunden später die unmittelbar hiervon betroffenen Zellaerale (je etwa 2000 Zellen) untersucht. Dabei stellte es sich heraus, dass die Polyploidisierung bereits zu einem Zeitpunkt einsetzt, an dem noch gar keine morphologischen und histologischen Veränderungen am Blatt wahrgenommen werden können (Tabelle)[4].

Es darf also – soweit dies die hier angewendeten biologischen Untersuchungsmethoden erlauben – als sicher angenommen werden, dass das galleninduzierende Sekret der Reblaus primär auf den Zellkern wirkt und hier polyploidisierende Vorgänge bedingt.

Ob der Reblausspeichel darüber hinaus noch andere, für die weitere Entwicklung und Gestaltung der Galle erforderliche Reize[5] ausübt, kann vorerst noch nicht entschieden werden. Es liegen jedoch bisher keine Beobachtungen vor, die für eine solche Annahme sprechen könnten.

F. Anders

Forschungsinstitut für Rebenzüchtung, Geilweilerhof, Siebeldingen/Pfalz, den 22. Mai 1956.

Résumé

La transmission expérimentale de la salive du Phylloxéra peut stimuler les jeunes feuilles de la vigne se trouvant encore dans la phase de végétation à former des galles. A cet égard, l'endopolyploidisation du tissu foliaire qui est exposé à la stimulation de la formation gallicole prouve un événement fondamental de la cécidogenèse.

[2] F. Anders, Verh. dtsch. Zool., Erlangen *1955*, 421; Exper. *11*, 322 (1955).

[3] L. Geitler, Protoplasmatologia *6*, 1 (1953). – E. Tschermak-Woess, Protoplasma *46*, 798 (1956).

[4] Im normalen Blatt der Rebe ist die Endomitose eine zwar natürliche, aber offenbar seltene Erscheinung. Allerdings bestehen hinsichtlich ihrer Häufigkeit sortentypische Unterschiede.

[5] Es wäre hier namentlich an zellteilungsfördernde Reize zu denken, zumal bei der Reblausgalle meist – aber nicht immer [vgl. W. Niklowitz, Phytopath. Z. *24*, 299 (1955)] – eine ausgesprochene Zellproliferation beobachtet werden kann. Da es sich jedoch hierbei in den Fällen, in denen eingehendere Untersuchungen möglich waren, meist nicht um echte mitotische, sondern um amitotische Zellteilungen und «Zellunterteilungen» handelt, kann vermutet werden, dass diese mit einer vorausgegangenen Endopolyploidisierung in Beziehung stehen und somit Sekundärvorgänge sind, in deren Verlauf höhere Polyploidiegrade auf niedere reduziert werden.

Renal Ammonia Production as a Model for the Study of Enzyme Adaptation in Mammals*

Induction is defined as an increase in cellular enzyme concentration as a consequence to the application of an inducer, such as the substrate of an enzyme. Enzyme induction (adaptation) in microorganisms was first observed by Wortmann[1] and has been studied extensively in recent years[2]. While the existence of this phenomenon has generally been accepted for microorganisms, it is still doubtful whether it occurs in mammalian cells. Since the first claim of induction of pancreatic enzymes by Pavlov[3], reports on induction of salivary amylase, pancreatic enzymes and hepatic argin-

* This investigation was supported by a research grant, RG-3795, from the National Institutes of Health, United States Public Health Service.

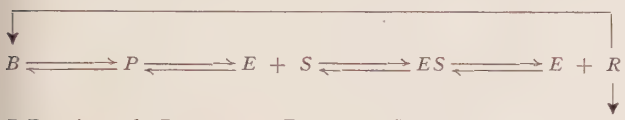
[1] J. Wortmann, Z. physiol. Chem. *6*, 287 (1882).

[2] J. Monod and M. Cohn, Advances in Enzymology *13*, 67 (1952).

[3] I. P. Pavlov, *The Work of the Digestive Glands* (Charles Griffin and Co. Ltd., London 1910).

ase have been published[4]. Most of these studies are open to criticism, since one or more of the following criteria were not fulfilled: (1) Enzyme concentration must increase on a cellular basis to exclude hyperplasia, changes in hydration, etc., (2) the enzyme assays should be so designed that substrate and cofactor availability does not limit enzyme activity and (3) nonspecific alterations due to changes in the nutritional or hormonal status of the animals must be excluded.

MANDELSTAM[5] recently analyzed the kinetics of enzyme induction in microorganisms and proposed the following working hypothesis: The enzyme (E) is in a reversible equilibrium with its inactive precursor (P) which again is in an equilibrium state with the protein pool (B) of the cell. The substrate or any other inducer which will activate the enzyme system will cause an increased number of enzyme-substrate complexes (ES) and thereby shift the equilibrium in a way which will tend to increase enzyme synthesis. This is depicted in Figure 1.



B Protein pool; P precursor; E enzyme; S substrate; ES enzyme-substrate complex; R reaction product.

Fig. 1.—Mass action theory of enzyme induction[5].

The above hypothesis can be applied to the rise in renal glutaminase activity concomitant with increased ammonia excretion in acid loaded guinea pigs. Urinary ammonia is produced by enzymatic hydrolysis of glutamine[6]. Administration of acid to mammals leads to an acute as well as chronic increase in ammonia excretion. While the acute increase must be considered as a stimulus or 'kinetic change', the slow increase occurring over several days is probably due to induction or adaptation of the ammonia producing enzymes in the kidney. The most important enzyme for urinary ammonia production is glutaminase I, a phosphate activated enzyme with an optimal pH of 7·5, which splits glutamine into ammonia and glutamic acid[7]. This enzyme is primarily localized in the papillary and collecting ducts of the renal medulla[8]. Following stimulation and induction by daily administration of ammonium chloride, an increase in enzyme activity in the kidney was observed in rat slices[9] and homogenates[10] and in guinea pig homogenates[11]. The increase in enzyme concentration in the kidney and the *in vivo* ammonia excretion were roughly proportional[10].

Enzyme concentration is rarely the limiting factor for the activity of a biocatalytic system. More important are substrate availability, intracellular pH and the presence of effectors. We observed nevertheless that ammonia production by renal glutaminase I becomes limiting for ammonia excretion *in vivo*, if production is stimulated acutely by the administration of acid[12]. Using this system for a study of enzyme induction, it is therefore not only possible to measure enzyme concentration (E) *in vitro*, but also the reaction product (R) as excreted *in vivo*. Since in the guinea pig physico-chemical factors have little influence on ammonia excretion as compared to dog and man[13], this animal is particularly well suited for induction studies.

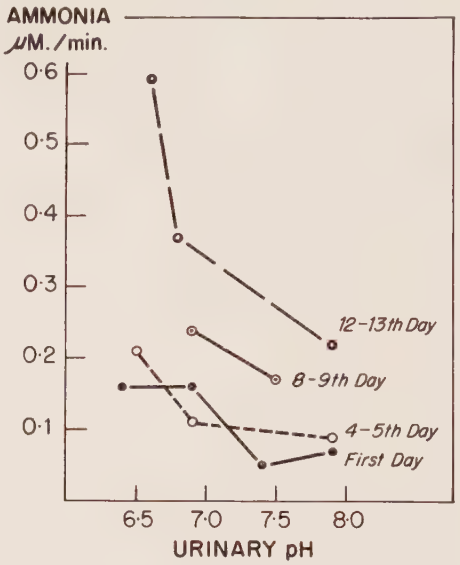


Fig. 2.—Increase in ammonia response with relation to urinary pH during induction.

In the present investigation ammonia excretion was followed prior to and following administration by stomach tube of an acid load of 0·5 *mM* ammonium chloride per 100 g body weight. Six animals weighing 540–580 g were used. The animals were kept in metabolic cages, and the urine collected for 1 h prior to (basal excretion) and 1 h after the stimulus had been applied. The administration of ammonium chloride served two purposes, first, providing a maximal stimulus for ammonia excretion and, second, inducing glutaminase I. The concentration of this enzyme in the whole kidney at the end of the induction period, i.e. 14 days approximately doubles[11].

Since the acid-base balance of the animal is a good measure of the extent of acute stimulation of the ammonia producing mechanism, the individual results are correlated with the urinary pH. As shown in Figure 2, ammonia excretion progressively rose to reach a peak at the 12–13th day after the beginning of the daily administration of ammonium chloride. For any given pH level ammonia excretion approximately doubled during induction. But even if the urinary pH is not taken into consideration, a similar pattern is observed. Figure 3 shows the response to the stimulus (ammonium chloride) on a particular day as compared to the basal excretion on that same day. The ammonia response following an acid load prior to induction was taken as 1, and the response during induction expressed as per cent of the preinduction response. Peak induction was observed between the 6th and 10th day, and a linear relationship

[4] W. E. KNOX, V. H. AUERBACH, and E. C. C. LIN, Physiol. Rev. *36*, 164 (1956).

[5] J. MANDELSTAM, Biochem. J. *51*, 674 (1952).

[6] D. D. VAN SLYKE *et al.*, J. biol. Chem. *150*, 481 (1943).

[7] R. RICHTERICH-VAN BAERLE, L. GOLDSTEIN, and EARL H. DEARBORN, Enzymologia (in press).

[8] R. RICHTERICH-VAN BAERLE, L. GOLDSTEIN, and EARL H. DEARBORN, Nature *178*, 698 (1956).

[9] B. M. A. DAVIES and J. YUDKIN, Biochem. J. *52*, 407 (1952).

[10] F. C. RECTOR, D. W. SELDIN, and J. H. COPENHAVER, J. clin. Invest. *34*, 20 (1955).

[11] L. GOLDSTEIN, R. RICHTERICH-VAN BAERLE, and EARL H. DEARBORN, Proc. Soc. exp. Biol. Med. (in press).

[12] R. RICHTERICH-VAN BAERLE, L. GOLDSTEIN, and EARL H. DEARBORN, J. clin. Invest. (in press).

[13] R. RICHTERICH-VAN BAERLE, L. GOLDSTEIN, and EARL H. DEARBORN, Science *124*, 74 (1956).

between the increased response and the time involved was observed.

The induction rate, i.e. the induction occurring per unit time, can either be logarithmic or linear, depending on whether the reaction product (R) is used as building material for the enzyme (E) or is taken out of the equilibrium, as shown in Figure 1. Since the end product, ammonia, is excreted in the urine and thereby taken out of the equilibrium, the observed linear response is consistent with Mandelstam's hypothesis. It may be concluded that the hypothesis of Mandelstam cannot only be applied to enzyme induction in microorganisms, but also to enzyme adaptation in mammals.

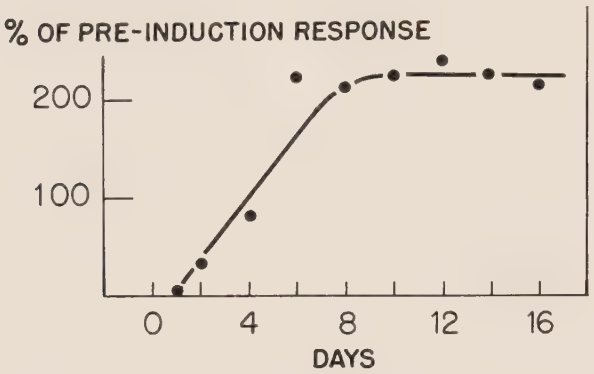


Fig. 3.—Increase in ammonia response during induction.

For the time being it is convenient to interpret adaptation from a teleological viewpoint, i.e. in the case of increased urinary ammonia excretion in chronic acidosis to consider this as a mechanism protecting the animal from an excessive loss of base. This phenomenon explains the loss of diuretic effect of ammonium chloride when this drug is administered for several days. Instead of sodium and potassium, ammonium is excreted, while the other cations are retained. This same phenomenon is probably important in renal diseases with acidosis. Further investigation of induction, experimental and spontaneously occurring in diseases, is warranted, since the prognosis of many metabolic diseases is possibly dependent on the degree of adaptation.

R. Richterich-Van Baerle[14] and
L. Goldstein

Department of Pharmacology, Boston University School of Medicine, Boston, Massachusetts, October 4, 1956.

Zusammenfassung

Chronische Verabreichung von Säure führt zu einer erhöhten Glutaminase-I-Konzentration in der Niere und zu einer gesteigerten Ammoniakausscheidung im Urin. Das ammoniakproduzierende biokatalytische System (Glutaminase I) ist besonders gut zum Studium der Enzymadaptation (Induktion) bei Säugetieren geeignet. Der Stand der Adaptation kann nicht nur durch die Bestimmung der Enzymveränderungen in der Niere, sondern auch durch den Nachweis des Reaktionsproduktes (Ammoniak) im Urin am lebenden Tier beurteilt werden.

[14] Present address: 1. Medizinische Universitätsklinik, Bürgerspital Basel, Switzerland.

The Kinetics of Sulphatase A

The anomalous kinetics of the hydrolysis of dipotassium 2-hydroxy-5-nitrophenyl sulphate (nitrocatechol sulphate) by ox liver aryl sulphatase A (sulphatase A) were first noted in this laboratory[1] and similar anomalies have since been detected in the corresponding enzymes of rat[2] and human[3] liver. The reaction velocity is not directly proportional to the enzyme concentration but with incubation times of 1 h it is linearly related to the enzyme concentration raised to the power of 3/2[4]. It was suggested[4] that this effect might be due to a polymerisation of the enzyme. Dodgson and Spencer[5] showed the fundamental anomaly to be that the reaction was not of zero order at low concentrations of enzyme and suggested an explanation for this effect in a series of competing reactions involving the enzyme, substrate and reaction products. Simultaneously, Roy[6] showed that nitrocatechol sulphate used in these studies was impure containing up to 10% of nitropyrogallol disulphate which could be removed by paper electrophoresis. It was also shown[6] that preparations of nitrocatechol sulphate obtained through its methylene blue salt did not exhibit these anomalous kinetics, the reaction being of zero order and the velocity directly proportional to the enzyme concentration. This seemed excellent evidence for the suggestion[6] that the anomalies might be due to the use of impure substrate preparations but more recent work has cast some doubt on this interpretation as specimens of nitrocatechol sulphate free from nitropyrogallol sulphate still give anomalous kinetics[8]. In view of the increasing use of nitrocatechol sulphate as a substrate in sulphatase assays it seems that a more detailed report of the observations might be of value.

In the present studies the nitrocatechol sulphate was free from nitropyrogallol disulphate and the experimental procedures were those already described in detail[9]. The enzyme was ox liver sulphatase A–3[4]. Assays were carried out at 37° in 0·15 M acetate buffer, pH 5·0, and at a substrate concentration of 0·003 M nitrocatechol sulphate.

Typical progress curves for the hydrolysis of nitrocatechol sulphate by sulphatase A are shown in Figure 1 and in Figure 2 is shown the relationship between enzyme concentration and reaction velocity. The progress curves consist typically of three parts: stage 1, in which the initial velocity decreases rapidly; stage 2, during which the velocity may fall to almost zero; and stage 3 when the velocity rises again to an almost constant value which is considerably less than the initial velocity. The relative proportions of these three stages vary considerably with changes in enzyme concentration and with those used in the original work[1] stage 2 disappears so that the reaction approximates to one of zero order. Preincubation of the enzyme in the absence of substrate did not significantly alter the shapes of these progress curves. Increasing the substrate concentration to 0·01 M caused an increased velocity during stage 1 and a pro-

[1] A. B. Roy, Biochem. J. *53*, 12 (1953).
[2] R. Gianetto and R. Viala, Science *121*, 801 (1955).
[3] K. S. Dodgson, B. Spencer, and C. H. Wynn, Biochem. J. *62*, 500 (1956).
[4] A. B. Roy, Biochem. J. *55*, 653 (1953).
[5] K. S. Dodgson and B. Spencer, Biochem. J. *62*, 30P (1956).
[6] A. B. Roy, Biochem. J. *62*, 35P (1956).
[7] A. B. Roy and L. M. H. Kerr, Nature *178*, 376 (1956).
[8] A. B. Roy and L. M. H. Kerr, Nature *178*, 376 (1956). – K. S. Dodgson and B. Spencer, Biochim. biophys. Acta *21*, 175 (1956).
[9] A. B. Roy, Biochem. J. *53*, 12 (1953); *55*, 653 (1953).

longation of stage 2 but the velocity in stage 3 was apparently unaltered. Lowering the pH to 4·5 made no significant difference to the progress curves but at pH

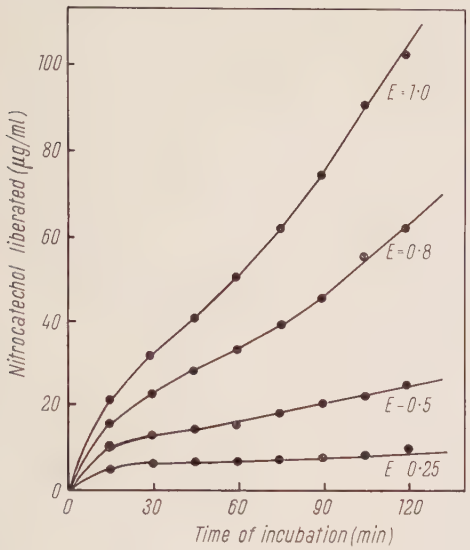


Fig. 1.—Progress curves for the hydrolysis of nitrocatechol sulphate (0·003 *M*) at pH 5·0 by sulphatase A. The relative enzyme concentrations are indicated on the appropriate curves.

6·0 the length of stage 2 was greatly prolonged, becoming important even at high concentrations of enzyme. The most interesting effect was that of SO_4^{2-}-ions: in the presence of 0·001 *M* SO_4^{2-}-ions stage 2 virtually disappeared, even at low enzyme concentrations, as shown in Figure 3. This effect was still obvious at pH 6·0 and is therefore presumably responsible for the pronounced activation of sulphatase A by SO_4^{2-}-ions at that pH[10].

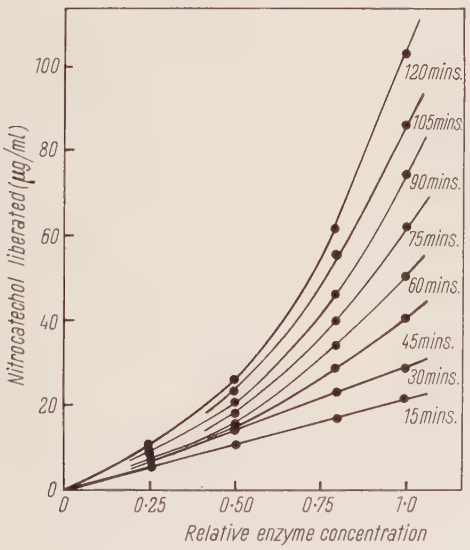


Fig. 2.—Effect of varying times of incubation on the relation between the concentration of sulphatase A and the velocity of the hydrolysis of nitrocatechol sulphate.

Preincubation of the enzyme with SO_4^{2-}-ions in the absence of substrate did not alter the progress curves from those in Figure 3. The addition of nitrocatechol (0·1 *mM*) to the reaction mixture caused an overall increase in the reaction velocity. When both nitrocatechol and SO_4^{2-}-ions were added in equivalent amounts their effects were additive. For comparison with these results Figure 4 shows curves obtained using substrate preparations purified via the chloroform-soluble methylene blue salt: the completely normal kinetics of this hydrolysis are obvious.

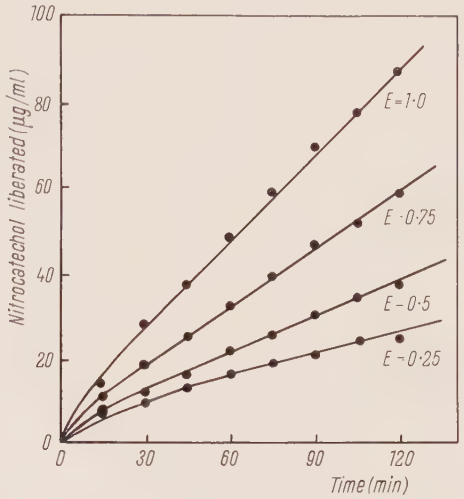


Fig. 3.—Effect of 0·001 *M* K_2SO_2 on the progress curves of the hydrolysis of nitrocatechol sulphate by sulphatase A.

One point of considerable importance was whether these anomalous kinetics were shown for the hydrolysis of substrates other than nitrocatechol sulphate. The high specificity[4] of sulphatase A made detailed study of this point difficult as to obtain results of immediate significance it was essential to use the enzyme under the same conditions for the hydrolysis of all the substrates. Figure 5 illustrates the hydrolysis of 0·05 *M* *p*-nitrophenyl sul-

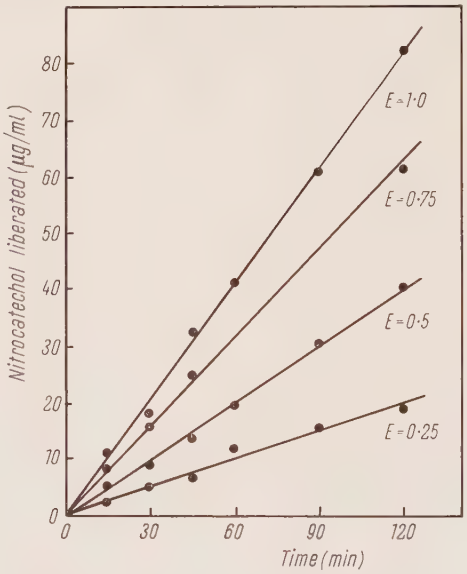


Fig. 4.—Progress curves for the hydrolysis by sulphatase A of nitrocatechol sulphate obtained via the methylene blue salt.

phate by sulphatase A. It is obvious that the reaction does not show the anomalies characteristic of the hydrolysis of nitrocatechol sulphate, the progress curves being simply those to be expected if the enzyme were unstable under the experimental conditions. It can also be seen that the reaction velocity is not directly related to the enzyme concentration. The addition of 0·001 *M* SO_4^{2-}-ions

[10] A. B. Roy, Biochem. J. *59*, 8 (1955).

did not alter the progress curves although it caused considerable inhibition. These results are not in agreement with those obtained for human sulphatase A by Dodgson and Spencer[11] who state that the hydrolysis of *p*-nitrophenyl sulphate exhibits the same anomalies as that of nitrocatechol sulphate.

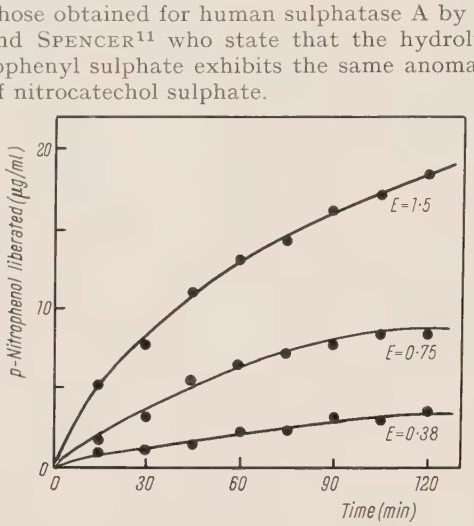


Fig. 5. — Progress curves for the hydrolysis of *p*-nitrophenyl sulphate (0·05 *M*) at pH 5·0 by sulphatase A.

These results are extremely difficult to interpret and any explanation must account for the following facts:

(1) During the hydrolysis of nitrocatechol sulphate the reaction velocity rapidly falls and then rises again. Under identical conditions with *p*-nitrophenyl sulphate the velocity falls but does not subsequently rise.

(2) The rise in velocity of the hydrolysis of nitrocatechol sulphate is greatly enhanced by 0·001 *M* SO_4^{2-} ions although higher concentrations are inhibitory. The hydrolysis of *p*-nitrophenyl sulphate is not activated.

(3) Nitrocatechol increases the rate of hydrolysis of its sulphate.

(4) Preincubation of the enzyme in the absence of substrate, with or without nitrocatechol or SO_4^{2-} ions, makes no difference to the progress curves.

(5) Purification of the nitrocatecholsulphate through its methylene blue salt gives preparations which do not exhibit anomalous kinetics.

From these data it is impossible to decide whether or not the anomalies are due to some peculiarity of the nitrocatechol sulphate or to some inherent property of the enzyme. The differences in behaviours between nitrocatechol sulphate and nitrophenyl sulphate suggests the former, but on the other hand this difference might simply be due to the much lower affinity and rate of hydrolysis of nitrophenyl sulphate[4]. As preincubation of the enzyme in the absence of substrate does not affect the progress curves it seems that the fall in velocity in stage 1 of the hydrolysis is due not to a simple inactivation of the enzyme, but to some complex reaction involving the substrate. Further, as the reaction velocity increases again in stage 3 it must be presumed that the inactivation in stage 1 is reversible. This increase in velocity in stage 3 cannot be directly due to the action of nitrocatechol and SO_4^{2-} ions liberated by the hydrolysis as if this were so then a similar effect would be expected on adding SO_4^{2-} ions to the system hydrolysing nitrophenyl sulphate.

Dodgson and Spencer[5] proposed an explanation based on the substrate inhibition occurring with nitrocatechol sulphate. They suggested that this substrate inhibition differed from the normal type in that it was slow reaction, so accounting for the drop in velocit during stage 1. They then suggested that the later rise i velocity was due to a reversal of the substrate inhibitio by the reaction products. Such an explanation seems im probable as it is difficult to see how the reaction pro ducts could reverse the substrate inhibition.

The following explanation seems a possible alternative If it is supposed that the enzyme-substrate complex (ES can react in two ways, one reforming the active enzym (E) and the other giving an inactive enzyme (E′), the the following equilibria must be considered during th reaction:

$$E + S \rightleftharpoons ES \begin{cases} \rightarrow E + \text{Products} \\ \rightarrow E' + \text{Products.} \end{cases}$$

The rate at which the inactivation of the enzyme wil occur during the hydrolysis of nitrocatechol sulphat will therefore be governed by the kinetics of the variou reactions. Further, as the reaction products accumulate or are added, it is possible that the active form of th enzyme, E, could be reformed from the inactive one, E′ if the appropriate equilibrium constants were of the correct magnitude. In the case of the hydrolysis of nitro phenyl sulphate, on the other hand, the equilibrium

$$ES \rightleftharpoons E' + \text{Products}$$

may lie so far to the right that the addition of the reac tion products might make relatively little difference t the rate of formation of E′. Not all the experimenta findings can be explained on this basis. It might be ex pected from the above that the addition of SO_4^{2-} ions a the beginning of the reaction would prevent the initia rapid formation of E′ but as seen from Figure 3 this doe not occur. Again the results using the substrate obtaine via the methylene blue salt cannot be explained on th above basis.

These points suffice to show the extremely comple nature of the kinetics of sulphatase A and although th hypothesis proposed may be incorrect it provides a basi for further investigation. They also show the dangers in herent in the use of nitrocatechol sulphate in the assay of sulphatases of the type of sulphatase A: other sul phatases apparently do not show these anomalies[12] sc that the use of this substrate in their assay is straigh forward.

A. B. Rov

Department of Biochemistry, University New Buildings, Edinburgh, July 17, 1956.

Résumé

Les cinétiques de l'hydrolyse du sulfate de nitro- catéchol par la sulfatase A sont très anormaux parce qu'il n'y a aucune relation linéaire entre la vitesse de la réaction et la concentration de l'enzyme. La réaction tient trois phases: dans la première, la vitesse décroît rapidement, dans la deuxième, elle diminue de plus en plus tandis qu'elle s'accroît dans la troisième. La réaction est très sensible à la composition du mélange réactionel, et l'addition des produits de la réaction, particulièrement le sulfate inorganique, augmente la vitesse de l'hydrolyse. En utilisant comme substrat le *p*-nitrophénylsulfate, ces irrégularités ne sont pas constatées.

Une interprétation de ces résultats est présentée!

[11] K. S. Dodgson and B. Spencer, Biochim. biophys. Acta *21*, 175 (1956).

[12] K. S. Dodgson, B. Spencer, and K. Williams, Biochem. J. *61*, 374 (1955). – D. Robinson, J. N. Smith, B. Spencer, and R. T. Williams, Biochem. J. *51*, 202 (1952).

Fractionnement par ultracentrifugation d'une nucléoprotéine de thymus de veau présentant une résistance marquée à la déprotéinisation

L'étude par ultracentrifugation de la dissociation des nucleoprotéines en solution molaire a fait l'objet de nombreux travaux[1] et l'on admet en général qu'il y a scission entre l'acide nucléique et l'histone à cette concentration ionique. Cependant les auteurs ne sont pas d'accord sur le degré de dissociation notamment dans le cas de la nucléohistone de thymus de veau où des valeurs très diverses ont été avancées (de 30%[2] à 100%[3]). Un cas de non dissociation de nucléoprotéine isolée de noyaux de foie de rat a même été signalé[4].

Au cours de nos recherches, nous avons eu l'occasion de préparer une nucléoprotéine de thymus de veau à partir d'un organe prélevé très tôt après la mort de l'animal et cette nucléoprotéine présentait une résistance tout à fait remarquable à la déprotéinisation par saturation avec du chlorure de sodium[5]. Cette nucléoprotéine, extraite de glandes obtenues moins d'une heure après la mort de l'animal, avait été purifiée aussi rapidement que possible pour la débarrasser des enzymes cellulaires puis avait été dissoute en solution molaire et saturée avec du sel. Cette solution résultante était si stable qu'il ne se faisait pas de précipitation d'histone dans le milieu. Par dilution à concentration isotonique en sel, un complexe nucléoprotéique précipitait et cela encore 2 mois après saturation. En opposition, lorsque nous avons traité au chlorure de sodium saturé pour la déprotéiniser une nucléohistone préparée dans les mêmes conditions que précédemment, mais à partir de glandes obtenues 2 h après la mort de l'animal, l'histone en solution saturée commençait à précipiter dès les premiers jours qui suivaient le contact avec le sel et après deux semaines il n'était plus possible d'obtenir de nucléoprotéine par dilution en milieu isotonique.

A la suite de cette observation il nous a paru intéressant d'étudier le comportement à l'ultracentrifugation de cette nucléoprotéine douée d'une si remarquable résistance à l'action du ClNa en solution saturée. Nous avons trouvé après ultracentrifugation que cette nucléoproteine présente encore, en milieu salin, un certain degré de dissociation et les dosages chimiques, qui ont été effectués sur les diverses fractions séparées (notamment sur un surnageant obtenu après 3 h de centrifugation à 145000 *G*), ont montré que la fraction protéique d'une telle nucléoprotéine est hétérogène. Ce surnageant était à peu près totalement dépourvu de phosphore et renfermait une fraction protéique dont la relation N arginine/N protéique (= 8,1%) est de beaucoup inférieure à celle d'une histone (= 25%). Cette fraction protéique nous semble-t-il, peut représenter soit une partie de l'histone pauvre en arginine et riche peut-être en lysine[6] soit une simple contamination cytoplasmique. En admettant une répartition homogène dans le liquide centrifugé, nous avons pu calculer que cette fraction protéique pauvre en arginine renfermait 26,3% de l'azote total protéique contenu dans notre solution de nucléoprotéine en expérience.

Par ailleurs nous avons noté que la répétition du processus de dissolution en milieu ClNa 1 *M* suivi de précipitation en milieu physiologique (0,14 *M*) qui s'accompagne habituellement d'une légère déprotéinisation a un effet encore moins marqué dans le cas de la nucléoprotéine résistante à l'action des fortes concentrations salines.

T. Sakaki[7], A. Knobloch et R. Vendrely

Laboratoire de Recherches sur les Macromolécules, Strasbourg, France, le 26 juin 1956.

Summary

Concerning the degree of resistance to strong saline solution, differences are noted between the nucleoproteins extracted from calf thymus received very soon after the death of the animal (resistant nucleoproteins) and nucleoproteins of calf thymus received later (susceptible nucleoproteins).

[1] *Cf.* P. F. Davison, B. E. Conway et J. A. V. Butler, Progr. Biophys. *4*, 148 (1954).

[2] Q. Van Winkle, données non publiées, citées par: J. G. Rabatin, R. Friedland et W. J. Frajola, J. biol. Chem. *203*, 23 (1953).

[3] P. ex. A. E. Mirsky et A. W. Pollister, J. gen. Physiol. *30*, 117 (1946).

[4] J. M. Luck, D. W. Kupke, A. Rhein et M. Hard, J. biol. Chem. *205*, 235 (1953).

[5] Voir à ce propos l'observation de S. Zamenhof, G. Griboff et N. Marullo, Biochim. biophys. Acta *13*, 459 (1954). Ces auteurs ont signalé eux aussi que les nucléoprotéines, isolées de thymus prélevés rapidement après la mort de l'animal, montraient une résistance plus marquée à la déprotéinisation.

[6] P. F. Davison et J. A. V. Butler, Biochim. biophys. Acta *15*, 439 (1955).

[7] Boursier du Centre National de la Recherche Scientifique, Paris. Adresse actuelle: Faculté des Sciences de l'Université de Nagoya, Chikusa, Nagoya (Japon).

Variations de l'activité des auxines-oxydases dans les racines du *Lens*[1]

Introduction. L'activité des auxines-oxydases dans les racines du *Lens culinaris* Med. a été analysée dans des travaux antérieurs[2] où nous établissions les relations entre ces enzymes et les péroxydases, la genèse des péroxydes et les auxines dont l'étude, sur le même matériel, avait fait l'objet de diverses publications[3]. Cette présente note a pour but d'examiner l'action de quelques substances (2–4, dichlorophenol: DCP, 2–4, dinitrophenol: DNP, 2–4, dinitro-*o*-cresol: DNC et $MnCl_2 \cdot 4 H_2O$: Mn^{++}) sur la destruction de l'acide β-indolylacétique (ABIA).

Technique. Les plantules du *Lens* sont cultivées aseptiquement sur papier filtre sans cendre, en boîtes de Petri (obscurité, 20° ± 0,5). Lorsque leurs racines mesurent 18 mm ± 0,5 (200 sont employées pour chaque essai), les tissus sont broyés (– 16°) avec une solution tampon $KH_2 - Na_2PO_4$, $5{,}10^{-2}$ *M* (pH 6,1), puis centrifugés (15 min; 4000 g) et décantés (10 ml). L'analyse du contenu en protéines N, basée sur l'emploi de l'acide trichloroacétique (précipitation), $H_2SO_4 - H_2O_2$ (digestion), se fait par la méthode de Nessler. Pour évaluer l'activité des auxines-oxydases (exprimée en microgrammes d'ABIA détruit pour 0,1 mg de protéines

[1] Ce travail a pu être entreprise grâce à l'appui du *Fonds national suisse pour la Recherche scientifique.*

[2] P. E. Pilet et A. W. Galston, Physiol. Plant. *8*, 888 (1955). – P. E. Pilet, Act. Soc. helv. Sci. nat. *135*, 133 (1955).

[3] P. E. Pilet, Mem. Soc. vaud. Sci. nat. *64*, 137 (1951); Exper. *7*, 362 (1951); Phyton (Austria) *4*, 247 (1953); Rev. gén. Bot. *61*, 637 (1954). – P. E. Pilet et F. W. Went, Amer. J. Bot. *43*, 190 (1956).

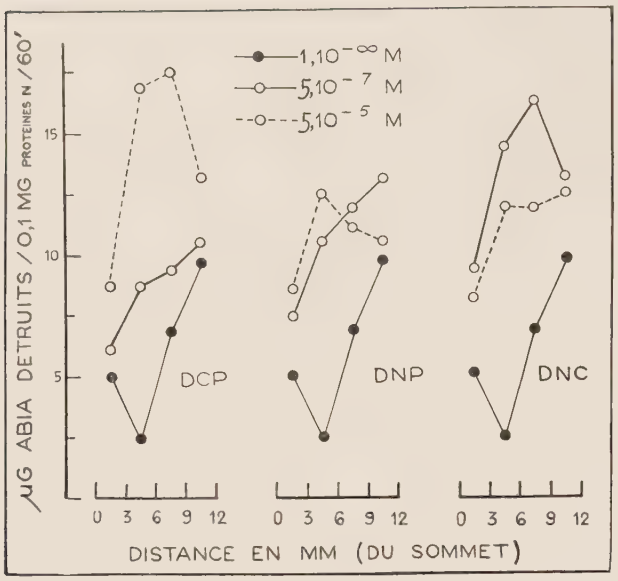


Fig. 1. Activité des auxines-oxydases de fragments de racines (3 mm) en présence de DCP, DNP et DNC. Chaque mesure porte sur l'examen de 200 fragments.

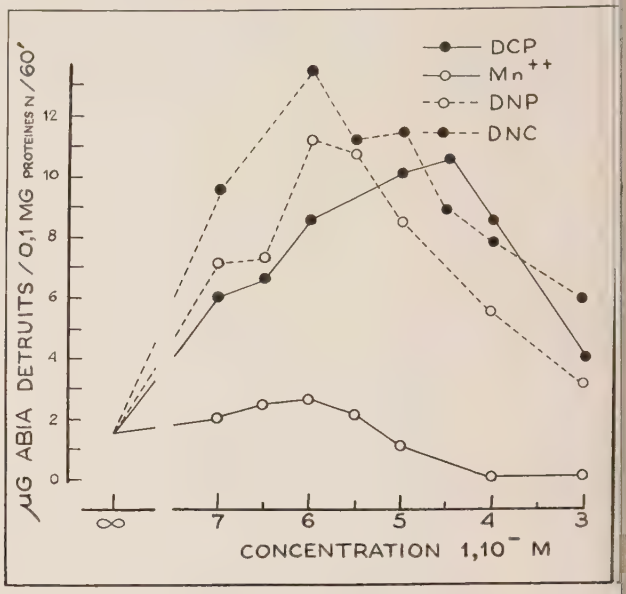


Fig. 2. Activité des auxines-oxydases de fragments de racines (région méristématiques: 0,5 à 3,0 mm du sommet), en présence de DCP, DNP, DNC et Mn^{++}. Chaque mesure porte sur l'examen de 200 fragments.

N et pour 60 min), 2 ml d'extrait sont mélangés à 5 ml de solution tampon (pH 6,1). Au temps 0, on ajoute 2 ml d'une solution d'ABIA ($1{,}10^{-3}$ *M*); on prend 2 ml du mélange qu'on ajoute à 8 ml du réactif [$FeCl_3$ 1,5 N (3 ml); H_2SO_4 1,84 et 97% (60 ml); H_2O redistillée (100 ml): réactif de Salkowski, Tang et Bonner modifié]. La titration se fait à 22°, $5 \pm 0{,}2$ et à l'aide du photocolorimètre Klett-Summerson (λ du filtre = 5350 Å $\pm$ 150).

Quelques travaux. L'action du DCP sur les auxines-oxydases dont nous relevions[2] le rôle d'activateur, a été aussi étudiée sur des tissus de *Pisum*[4] et en relation avec le Mn^{++}[5], facteur parfois inactif[6], mais qui peut inhiber[7] ou stimuler[8] la destruction de l'ABIA. Il était intéressant de comparer l'action du DCP sur les auxines-oxydases avec des produits voisins. Nous avons choisi le DNP[9] qui agit sur les processus d'oxydation[10], de phosphorylation[11] et sur les deshydrogénases [12] et le DNC qui, plus encore que le DNP, stimule la fixation d'O_2[13].

Résultats

Essai 1 (Fig. 1): Le DCP, le DNP et le DNC assurent une forte augmentation de l'activité des auxines-oxydases dans les fragments (3 mm) de racines du *Lens*. Cette stimulation est particulièrement nette dans les tissus jeunes. Elle peut être attribuée à l'activation, par ces substances, des processus d'oxydation.

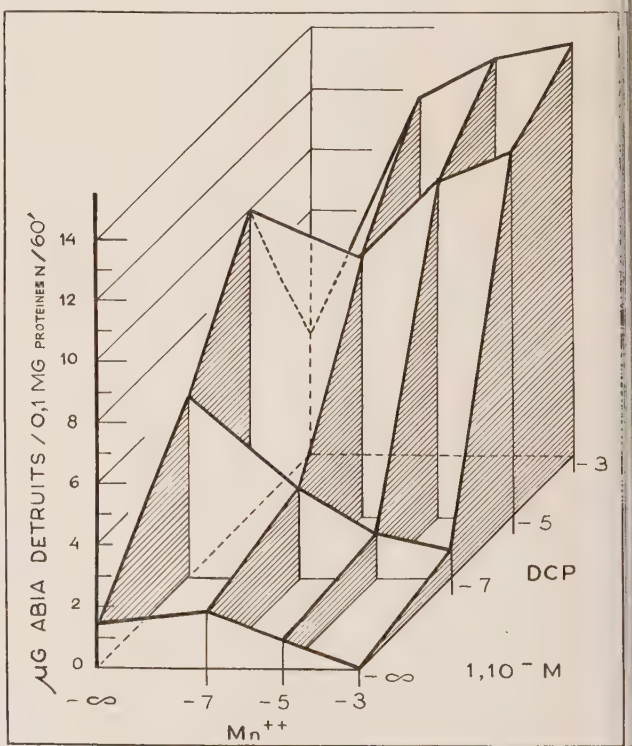


Fig. 3. Activité des auxines-oxydases de fragments de racines (région méristématique: 0,5 à 3,0 mm du sommet), en présence de Mn^{++} et de DCP appliqués en même temps à diverses concentrations. Chaque mesure porte sur l'examen de 250 fragments.

Essai 2 (Fig. 2): L'action comparée, pour des tissus prélevés dans la région méristématique (0,5 à 3,0 mm

[4] P. L. Goldacre, A. W. Galston et R. L. Weintraub, Arch. Biochem. Biophys. *43*, 358 (1953).

[5] W. S. Hillmann et A. W. Galston, Physiol. Plant. *9*, 230 (1956).

[6] A. C. Wagenknecht et R. H. Burris, Arch. Biochem. Biophys. *25*, 30 (1950).

[7] A. W. Galston, J. Bonner et R. S. Baker, Arch. Biochem. Biophys. *42*, 456 (1953).

[8] W. A. Gortner et M. Kent, J. biol. Chem. *204*, 593 (1953).

[9] C. E. Clifton, Advances Enzym. *6*, 269 (1946). – F. Lipmann et N. O. Kaplan, Ann. Rev. Biochem. *18*, 267 (1949).

[10] M. E. Krahl et G. H. A. Clowes, J. biol. Chem. *111*, 355 (1935); J. Cell. Comp. Physiol. *11*, 1 (1938). – J. Bonner, Amer. J. Bot. *36*, 429 (1949). – E. H. Newcomb, Amer. J. Bot. *37*, 264 (1950).

[11] R. D. Hotchiss, Advances Enzym. *4*, 155 (1944). – J. Mc Elroy, J. Cell. Comp. Physiol. *23*, 171 (1944).

[12] L. Massart et R. Dufait, Enzymologia *9*, 320 (1941).

[13] C. H. A. Clowes et M. E. Krahl, J. gen. Physiol. *20*, 145 (1936). – S. Kelly et G. S. Avery, Amer. J. Bot. *36*, 421 (1949).

comptés à partir de la pointe de la racine; les vieux tissus formant la coiffe étant éliminés) du DCP, du DNP, du DNC et du Mn^{++} est étudiée en fonction de leurs concentrations. Le pH, dont l'importance a été démontrée[14] est rigoureusement maintenu à 6,1, valeur qui correspond au maximum d'activité des auxines-oxydases[15]. On peut observer que le Mn^{++}, à fortes concentrations, inhibe, alors que le DCP, le DNP et le DNC activent toujours, mais plus ou moins fortement, les auxines-oxydases.

Essai 3 (Fig. 3): L'action combinée du DCP et du Mn^{++}, pour des tissus méristématiques (0,5 à 3,0 mm du sommet) est examinée. On peut remarquer que si le Mn^{++} est un inhibiteur des auxines-oxydases lorsqu'il est appliqué seul ou avec de faibles concentrations de DCP, son action devient nettement stimulatrice en présence de fortes doses de DCP. Ces résultats confirment donc, sur un autre matériel, les observations antérieures et suggèrent que le Mn^{++} doit agir essentiellement, en ce qui concerne l'inactivation de l'ABIA, en relation directe avec les composés phénoliques des tissus.

L'emploi de ces diverses substances fournit des perspectives nouvelles quant au problème du vieillissement des tissus qui paraît être placé sous le contrôle des auxines endogènes[16] et par conséquent des systèmes auxines-oxydasiques.

P. E. Pilet

Institut de Botanique, Université de Lausanne, le 14 septembre 1956.

Summary

2,4-dichlorophenol (DCP), 2,4-dinitrophenol (DNP) and 2,4-dinitro-*o*-cresol (DNC) applied at a concentration of $1 \cdot 10^{-7}$ to $1 \cdot 10^{-3}$ *M*, produce a dramatic increase in IAA-oxidase activity in young cells of *Lens* root. IAA destruction by 'breis' from root tissues was inhibited by Mn^{++} ion at low concentrations of DCP ($1 \cdot 10^{-\infty}$ to $1 \cdot 10^{-7}$ *M*), but was enhanced by Mn^{++} ion at higher ($1 \cdot 10^{-5}$ to $1 \cdot 10^{-3}$ *M*) DCP levels.

[14] G. Stenlid, Physiol. Plant. *2*, 61 (1949).

[15] Y. W. Tang et J. Bonner, Arch. Biochem. Biophys. *13*, 11 (1947).

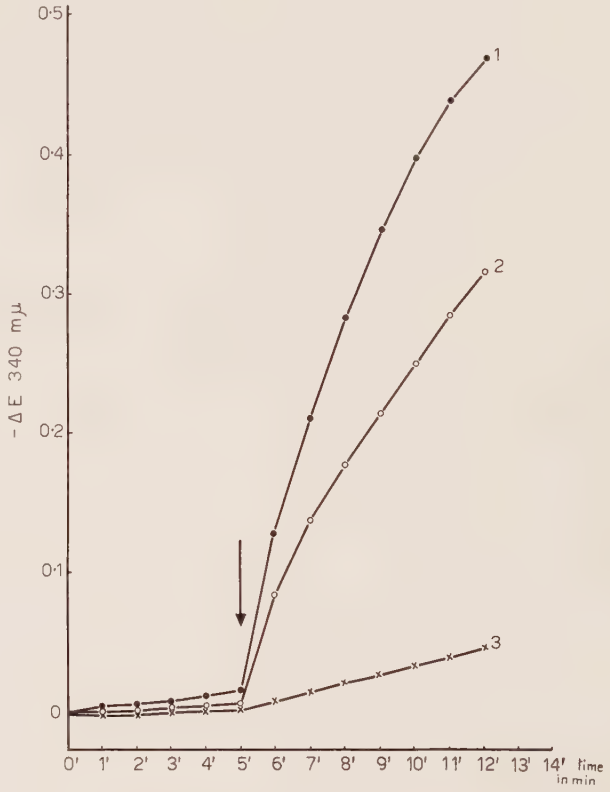
[16] P. E. Pilet, VIII Congr. int. Bot. (Paris) *11*, 178 (1954); Act. Soc. helv. Sci. nat. *135*, 133 (1955); Bull. Soc. bot. suisse *66*, 26 (1956).

Enzymatic Activities in the Perilymph Phosphohexoseisomerase and Lacticdehydrogenase

In some previous papers on the chemical composition of horse perilymph, we reported data on the amino acid, keto acid and protein content of this biological fluid[1].

The object of the present investigation was to study whether enzymatic activities could be detected in the perilymph. For this purpose we have analyzed phosphohexoseisomerase (PHI) and lacticdehydrogenase (LD) activities of horse perilymph compared with the blood serum and cerebro-spinal fluid activities[2].

Methods. The perilymph, serum and liquor were collected as previously described from horses immediately (15–30 min) after death. In order to obtain the necessary amount of perilymph, samples of this fluid from 25/30 animals were mixed together. The same operation was performed, to obtain comparable results, for serum and liquor. Enzymatic activities were determined in duplicate on fluids thus collected from three groups of animals. The liquids, stored when necessary at 0°C for a maximum of 24 h, were centrifuged before use at 3000 r.p.m. for 20 min.



Lacticdehydrogenase activity of serum (1), perilymph (2), and liquor (3). Same conditions as in the test; in this experiment the reaction was started by adding (at arrow) the piruvate.

PHI activity was tested according to the reaction: glucose-6-phosphate (G6P) ⟶ fructose-6-phosphate (F6P), determining the amount of F6P formed in 1 h at 37°C in an incubation mixture made up as follows: 0·3 ml 0·045 *M* G6P (4·5 mg K salt, obtained according to Seegmiller from Ba salt 'Sigma'[3]; 0·3 ml sodium diethylbarbiturate buffer 0·1 *M*, pH 7·8; 0·2 ml of the fluid under examination.

The reaction was stopped by adding 3 ml of 10% trichloroacetic acid. After centrifugation, 2 ml of the supernatant were used for the F6P determination, by Roe's method[4].

A standard of fructose was made each time under the same experimental conditions, and corrections for F6P values were made according to Umbreit *et al.*[5]

LD activity was followed according to the reaction:

$$DPNH + \text{piruvate} + H^+ \rightarrow DPN^+ + \text{lactate}$$

determining the amount of DPNH oxidized from the decrease in optical density at 340 mμ.

[1] E. Antonini, V. Casorati, and S. Crifò, Exper. *11*, 496 (1955); Revue de Laring. *1–2*, 59 (1956); La Ric. Scient. *25*, 3035 (1955); Ann. Otol. Rhinol. and Laryng. (in press).

[2] O. Bodansky, J. biol. Chem. *202*, 840 (1953). – F. H. Bruns, W. Jacob, and F. Weverink, Clin. chim. Acta *1*, 63 (1956).

[3] J. E. Seegmiller and B. L. Horecker, J. biol. Chem. *192*, 175 (1951).

[4] J. H. Roe, J. biol. Chem. *107*, 15 (1934).

[5] W. W. Umbreit, R. H. Burris, and J. F. Stauffer, *Manometric Techniques and Tissue Metabolism* (Burgess Publ., Minneapolis 1949).

The DPNH was prepared from DPN 'Sigma' by enzymatic reduction with alcohol and alcohol dehydrogenase, crystallized according to Racker[6].

Table I

PHI activity of perilymph, liquor and serum expressed in mg F6P formed per hour

	Perilymph	Liquor	Serum
mg F6P/ml/h .	2·51 ± 0·1	0·53 ± 0·07	1·08 ± 0·04
mg F6P/mg protein/h . .	0·82 ± 0·016	0·36 ± 0·05	0·016 ± 0·001

In a cuvette of the Beckman spectrophotometer were mixed: 0·48 μM DPNH in 0·1 ml; 3 μM piruvate in 0·1 ml; 0·3 ml $NaHCO_3$ 0·02 Mol; 2·5 ml phosphate buffer 0·1 Mol, pH 7·8. The reaction was started by adding 0·25 ml of the fluid under examination, and the decrease in optical density followed, at room temperature, for 10 min, taking readings every minute.

Proteins were determined in the fluids before each enzymatic test by Goa's micromethod[7].

Table II

LD activity of perilymph, liquor and serum expressed in Mol × 10^7 lactate formed per minute

	Perilymph	Liquor	Serum
Mol × 10^7 lactate/ml/min .	1·75 ± 0·07	0·22 ± 0·03	2·63 ± 0·2
Mol × 10^{-7} lactate/mg protein/min . .	0·58 ± 0·03	0·15 ± 0·025	0·04 ± 0·003

Results. In Table I and II the values for PHI and LD activities in perilymph, liquor and blood serum are reported. From these data it is evident that PHI and LD activities are present in the perilymph to a considerable degree. With reference to the protein content, much higher activities are found for perilymph than for liquor and serum. The activities for milligrams of protein are in perilymph, liquor and serum in the ratio 100:44:2 for PHI, and 100:26:7 for LD.

These results contribute to differentiate the perilymph from both blood serum and cerebro-spinal fluid.

E. Antonini, C. De Marco, S. Crifò

Institute of Biochemistry and Institute of Oto-rhinolaringology, University of Rome, July 20, 1956.

Riassunto

È stata messa in evidenza nella perilinfa di cavallo la presenza di notevole attività fosfoesosoisomerasica e latticodeidrogenasica. In rapporto al contenuto proteico tali attività enzimatiche risultano maggiori nella perilinfa che nel siero di sangue e nel liquor.

[6] E. Racker, J. biol. Chem. *184*, 313 (1950).

[7] J. Goa, Scand. J. clin. Lab. Invest. *5*, 218 (1953).

Physical Properties of Deoxyribonucleic Acid Isolated from Ehrlich Ascites Tumor Cells by Various Methods

The requirement for tumor cell deoxyribonucleic acid (DNA) to be used in certain biological studies in progress in this laboratory led to an examination of various methods for the isolation of this cell component.

The Ehrlich ascites carcinoma was employed throughout the investigations. DNA has been isolated from cells of this tumor by four different methods, two of which involved the use of surface active agents. In addition, DNA has been separated from deoxyribonucleoprotein isolated from this tumor by means of chloroform-octyl alcohol and by extraction with hot concentrated salt solution.

All samples were subjected to analysis for nitrogen and phosphorus, and a number of the physical properties of all samples were measured. A description of these physical properties comprises the main subject of this report.

Experimental. The Ehrlich ascites carcinoma was grown in Swiss albino mice. Seven to nine days after the intraperitoneal implantation of 10–12 × 10^6 tumor cells, the mice were sacrificed and ascitic fluids aspirated from the peritoneal cavities. The cells were freed of erythrocytes by washing in physiological saline in the manner described by McKee, Lonberg-Holm, and Jehl[1]. The washed cells were transferred to a mortar set in an alcohol-dry ice bath, and when thoroughly frozen were ground to a fine, homogeneous powder.

The powder was placed in a Waring blendor containing isotonic sodium chloride, pH 7·0 and 0·001 M with respect to sodium citrate, and was blended at low speed for 10–15 min. Nuclei were sedimented from the suspension by centrifugation at 2000 rpm for 20 min. The supernatant was discarded and the nuclei washed three additional times in saline-citrate solution.

DNA was isolated directly from such nuclei by the sodium xylene sulfonate method of Simmons, Chavos, and Orbach[2] (SCO) and the sodium dodecyl sulfate method of Kay, Simmons, and Dounce[3] (KSD).

Two more samples were obtained by first isolating deoxyribonucleoprotein from the nuclei by a technique derived from the methods of Stern[4] and Gajdusek[5]. In brief, this consisted of extracting the nucleoprotein by shaking the nuclei for 16–24 h in the cold with distilled water, precipitating the protein from the filtered extract at 0·14 M sodium chloride concentration, and further purifying it by three cycles of dissolution in distilled water and precipitation at isotonic sodium chloride concentration.

One sample of DNA was isolated from the nucleoprotein by the Mirsky and Pollister[6] modification of Sevag's chloroform-octyl alcohol technique[7]. A second was prepared by extracting the protein with 10% sodium

[1] R. W. McKee, K. Lonberg-Holm, and J. Jehl, Cancer Res. *13*, 537 (1953).

[2] N. S. Simmons, S. Chavos, and H. K. Orbach, Fed. Proc. *11*, 390 (1952).

[3] E. R. M. Kay, N. S. Simmons, and A. L. Dounce, J. Amer. chem. Soc. *74*, 1724 (1952).

[4] K. G. Stern, G. Goldstein, J. Wagman, and J. Schryver, Fed. Proc. *6*, 35 (1947).

[5] D. C. Gadjusek, Biochim. et biophys. Acta *5*, 377 (1950).

[6] A. E. Mirsky and A. W. Pollister, J. gen. Physiol. *30*, 117 (1946).

[7] M. G. Sevag, D. B. Lackman, and J. Smolens, J. biol. Chem. *124*, 425 (1938).

chloride solution, pH 7·4, as described by Tyner *et al.*[8]. DNA was precipitated from the chilled extract by the addition of 2 volumes of 95% ethanol, after which it was washed with ethanol and acetone and dried. Finally the nucleate was put in solution in distilled water, dialyzed for several days against frequent changes of distilled water and separated by lyophilization.

Table I

Sample	Drying method	% N	% P	N/P
SCO	*V**	13·81	8·45	1·63
	*O***	13·63	8·38	1·63
	*A****	14·35	8·77	1·64
KSD	*V*	14·05	8·40	1·67
	O	14·04	8·38	1·68
	A	14·34	8·50	1·69
C–O	*V*	13·27	8·10	1·64
	O	12·86	7·95	1·62
	A	13·11	8·10	1·62
NaCl	*V*	14·51	8·28	1·75
	O	14·71	8·32	1·77
	A	14·90	8·60	1·73

* Vacuum desiccator (96 h, 60–80 mm/25°C) ** Oven (48 h, 65°C) *** Abderhalden (96 h, 3 mm/80°C)

The samples were dried over calcium chloride in a vacuum desiccator (60–80 mm) for 96 h, in an oven at 65°C for 48 h, and in the Abderhalden apparatus for 96 h using P_2O_5 as the desiccant and boiling benzene (80°C) as a source of heat. The apparatus was operated at 3 mm. Nitrogen was determined by Nesslerization following sulfuric acid-hydrogen peroxide digestion, and phosphorus by the method of Fiske and Subbarow[9].

Specific absorption was measured in a Beckman spectrophotometer, model DU, and electrophoretic mobility was studied in a Spinco model H electrophoresis-diffusion apparatus. Sedimentation data were obtained from the Spinco model E analytical ultracentrifuge, and viscosity data by means of the Ostwald viscometer. Samples used for physical measurements were dissolved in a buffer containing 0·1 *M* KCl and 0·02 *M* NaOH which had been adjusted to pH 6·4 with cacodylic acid. Solutions were dialyzed against the same buffer before use.

Results and Discussion. The data are presented in Tables I and II. Each value represents the mean of several determinations. The method of drying had no effect on the N/P ratios of the products. This would be expected, as would the somewhat higher N and P values obtained for these samples dried in the Abderhalden apparatus.

Measuring the absorption of thymus DNA in 0·2 *M* NaCl, Reichman *et al.*[10] found E 1%/1 cm to be 213. Our determinations were carried out at $\Gamma/2 = 0{\cdot}12$ which should yield somewhat higher values. This appears to be the case for sample SCO.

Katz and Schachman[11] measured the sedimentation constant of thymus DNA prepared by the method of

Table II

Sample	$E^{1\%}_{1\text{ cm}}$ (260 mμ)	μ (× 10^5)	$-S^{H_2O}_{20°}$				$[\eta]_{c\to o}$
			0·6%	0·4%	0·2%	0·1%	
SCO	218	19·4	4·14	4·82	5·88	7·74	35·4
KSD	208	16·6	4·71	5·69	7·30	11·0	20·3
C–O	203	11·7	4·60	5·43	6·18	7·06	3·13
NaCl	224	15·1	—	6·90	—	—	2·08

Schwander and Signer[12], a preparation which has recently been described by Kawade and Watanabe[13] as being an excellent one. Their value, at 0·03% concentration, was S = 11. At 0·03% concentration, the sedimentation constant of our sample SCO would be close to 11, and that of sample KSD would be appreciably higher.

Viscosity measurements were made in an Ostwald viscometer at 20°C with an average shear rate of 350 s^{-1} as calculated from the formula of Kroeplin[14]. At this shear rate Schwander and Signer's preparation had a reduced viscosity of 25 at 15 mg% concentration. The values given in Table II were obtained by extrapolating to zero concentration. At a concentration of 15 mg%, the reduced viscosities of samples SCO and KSD would be 44 and 22 respectively. Inasmuch as our determinations were carried out in a medium of lower ionic strength (0·12 as compared to 1·7 employed by Schwander and Signer[12]), it might be more valid to compare our extrapolated values with the reduced viscosity measured at a concentration of 15 mg% by Schwander and Signer[12].

In general, the material prepared by the sodium xylene sulfonate method of Simmons, Chavos, and Orbach[2] seemed to give the most highly polymerized DNA, and to be comparable to the best preparations reported in the literature.

It is a pleasure to acknowledge the technical assistance of Mr. Harris Bird, Mr. Maurice Davies, Miss Mary Englert, and Mr. Robert F. J. McCandless.

J. S. Colter, R. A. Brown, and D. Kriichevsky

Viral and Rickettsial Section, Research Division, American Cyanamid Company, Lederle Laboratories, Pearl River, New York, July 19, 1956.

Zusammenfassung

Die Desoxyribonukleinsäure des Ehrlich-Karzinoms wurde nach vier verschiedenen Methoden isoliert und Stickstoff- und Phosphorgehalt sowie die physikalischen Eigenschaften für jedes der vier Präparate bestimmt. Die mit Hilfe von Natrium-Xylolsulfonat isolierte Desoxyribonukleinsäure scheint am stärksten polymerisiert zu sein.

[8] E. P. Tyner, C. Heidelberger, and G. A. Le Page, Cancer Res. *12*, 158 (1952).

[9] C. H. Fiske and Y. Subbarow, J. biol. Chem. *66*, 375 (1925).

[10] M. E. Reichman, S. A. Rice, C. A. Thomas, and P. Doty, J. Amer. chem. Soc. *76*, 3047 (1954).

[11] S. Katz and H. K. Schachman, Biochim. et biophys. Acta *18*, 28 (1955).

[12] H. Schwander and R. Signer, Helv. chim. Acta *33*, 1521 (1950).

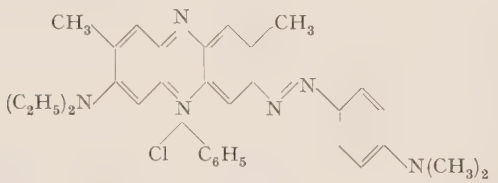
[13] Y. Kawade and I. Watanabe, Biochim. et biophys. Acta *19*, 513 (1956).

[14] H. Kroeplin, Kolloid-Z. *47*, 294 (1929).

Fehlen einer karzinogenen Wirkung von Janusgrün an Ratten*

Quantitative Versuche zur Krebserzeugung an Ratten mit 4-Dimethylaminoazobenzol[1] und ebenso mit 4-Dimethylaminostilben[2] hatten ergeben, dass die karzinogenen Effekte über die ganze Lebensdauer irreversibel fortbestehen («Summationswirkung»)[1] und bei der Zellteilung offenbar auch auf die Tochterzellen übertragen werden. Hieraus folgte, dass die Zellbestandteile, an denen die karzinogene Wirkung angreift und deren destruktive Veränderung schliesslich zur krebsigen Entartung der Zelle führt, nicht «de novo» gebildet werden können, sondern bei der Zellteilung ebenfalls verdoppelt werden müssen. Da nähere Angaben über ihre Lokalisation in der Zelle oder über ihre Funktion nicht möglich waren, wurden sie als «Duplikanten» bezeichnet. Die Auswertung der Versuchsergebnisse machte es in Übereinstimmung mit neueren Angaben[3] wahrscheinlich, dass die betroffenen Zellbestandteile nicht in der Einzahl, sondern in einer Vielzahl in den Zellen vorhanden sind, so dass auch plasmatische «Duplikanten» in Frage kommen[4].

Die Beobachtung, dass nach Applikation von karzinogenen aromatischen Kohlenwasserstoffen auf die Mäusehaut eine besonders starke und anhaltende Fluoreszenz in den *Mitochondrien* zu beobachten ist, veranlasste Graffi[5] zu der Annahme, ihre Veränderung stelle den spezifischen Vorgang bei der Kanzerisierung der Zelle dar. Da die Mitochondrien, für die eine «Duplikanten»-Natur angenommen wird[5], die wesentlichen Strukturen für die enzymatischen Oxydationen in der Zelle darstellen, führte Warburg[6] die Auffassung von Graffi als Stütze für seine interessante Theorie an, nach der eine Hemmung der Zellatmung die letzte und allgemeine Ursache der Krebsentstehung sei.



Mitochondrien werden durch den basischen Diazinfarbstoff *Janusgrün* elektiv vital gefärbt (Michaelis[7]) und offenbar auch vergiftet. Janusgrün ist ein hochwirksamer Hemmstoff für die Zellteilung (Seeigelei)[8] und vor allem für enzymatische Funktionen, die an den Mitochondrien lokalisiert sind, wie die Citrullinsynthese[9], die Succinoxydasen- und Zytochromoxydasenaktivität[10], sowie nach Leuthardt und Exner[11] auch für die Zellatmung. Aus diesen Gründen wäre vom Janusgrün (Formel) eine geradezu spezifische karzinogene Wirkung zu erwarten.

Ferner wird das Janusgrün nach den Untersuchungen von Güttes und Schmähl[12] im Organismus schnell gespalten, erscheint also gerade zu einer *intermittierenden* Hemmung der Zellatmung geeignet, die den Kanzerisierungsprozess besonders begünstigen soll. Nach Bielka[13] wird die karzinogene Wirkung von aromatischen Kohlenwasserstoffen durch gleichzeitige Applikation von Janusgrün gesteigert.

Aus diesen Gründen haben wir das Janusgrün auf karzinogene Wirkung untersucht. Die von uns verwendete Substanz erwies sich bei der papierchromatischen Untersuchung als einheitlich. Das Absorptionsmaximum bestimmten wir in methanolischer Lösung bei 645 mμ. Als Versuchstiere dienten Ratten unserer reinen Stämme BD I und BD III, deren Empfindlichkeit gegenüber karzinogenen Substanzen aus Vergleichsversuchen mit 4-Dimethylaminoazobenzol bekannt war. Die Prüfung erfolgte sowohl im Fütterungsversuch als auch bei subkutaner Injektion. Für beide Applikationsformen wurden die maximal verträglichen Einzeldosen experimentell ermittelt. Sie betrugen oral 20 mg/Ratte und subkutan 0,5 mg.

Im *Fütterungsversuch* erhielten 20 Ratten täglich je 20 mg in einer Mischkost verabreicht. Die Behandlungsdauer betrug 670 Tage, wobei einige Pausen eingeschoben wurden. Die aufgenommene Gesamtdosis erreichte 8,9 g/Ratte. Alle Tiere wurden bis an ihr natürliches Lebensende beobachtet. Die mittlere Lebensdauer betrug 650, die maximale 1034 Tage. Obwohl die applizierte Dosis etwa das 30fache der karzinogen wirksamen «Stop»-Dosis des Buttergelbs beträgt, trat keine maligne Geschwulst auf.

Im *Injektionsversuch* konnte wegen der lokal nekrotisierenden Wirkung des Janusgrüns nur 0,5 mg als Einzeldosis alle zwei Wochen gegeben werden. Die Behandlungsdauer betrug 802 Tage, die maximale Lebensdauer 902 Tage, die erreichte Gesamtdosis 33 mg. Bei keiner der 15 behandelten Ratten entstand eine Geschwulst.

H. A. Nieper und H. Druckrey

Laboratorium der Chirurgischen Universitätsklinik Freiburg i. Br., den 24. September 1956.

Summary

Janus green, a special dyestuff for coloring mitochondria and a poison with a remarkable respiration-inhibiting effect, was tested for carcinogenic activity in rats. Neither after oral nor subcutaneous injection was cancerisation observed.

* Die Untersuchungen wurden durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft ermöglicht.

[1] H. Druckrey und K. Küpfmüller, Z. Naturf. *3b*, 254 (1948).
[2] H. Druckrey und D. Schmähl, Exper. *12*, 185 (1956). – D. Schmähl und R. Mecke, Z. Krebsf. *61*, 230 (1956).
[3] B. Rajewsky, Z. Krebsf. *56*, 274 (1949). – C. O. Nordling, Brit. J. Cancer *7*, 68 (1953). – P. Stocks, Brit. J. Cancer *7*, 407 (1953).
[4] H. P. Rusch, Cancer Res. *14*, 407 (1954). – C. D. Darlington, Brit. J. Cancer *2*, 118 (1948). – R. Danneel und E. Güttes, Naturwissenschaften *39*, 331 (1952).
[5] A. Graffi, Abhandlg. dtsch. Akad. Wiss., Berlin *1*, 151 (1953).
[6] O. Warburg, *Krebsforschung und Krebsbekämpfung 34*, 3, 41 (1955); Naturwissenschaften *42*, 401 (1955); Science *123*, 309 (1956).
[7] L. Michaelis, Arch. mikr. Anat. *55*, 588 (1900).
[8] H. Druckrey, P. Danneberg und D. Schmähl, Arzneim. Forsch. *1*, 151 (1953).
[9] F. Leuthardt und A. F. Müller, Exper. *4*, 478 (1948).
[10] G. H. Hogeboom, W. C. Schneider und G. Pallade, J. biol. Chem. *172*, 619 (1948).
[11] F. Leuthardt und B. Exner, Helv. chim. Acta *36*, 519 (1953).
[12] E. Güttes und D. Schmähl, Arzneim.-Forsch. *4*, 479 (1954).
[13] H. Bielka, Naturwiss. *42*, 299 (1955).

Su un criterio di valutazione dell'attività di un farmaco antitubercolare nella cavia infettata con carica massiva

Nella tbc. sperimentale, allo scopo di ridurre al minimo le cause accidentali che possono interferire nella valutazione dell'attività di un antimicobatterico, già da

tempo siamo stati indotti[1] a sperimentare nella cavia sottoposta ad infezione massiva (con 1 mg di germi, peso umido, per via inguinale). Con questa metodica si conseguono particolari condizioni: a) rapidità dell'evoluzione del processo tbc., che al 70° giorno dall'infezione raggiunge nei controlli una intensità tale da esser ritenuta pari al 100%; b) maggiore costanza – a seconda del tempo intercorso dall'infezione – delle manifestazioni anatomiche a carico dei varii organi, sia dal punto di vista qualitativo che quantitativo; c) eliminazione o riduzione – sotto la carica batterica massiva e l'uso immediato del farmaco – d'interferenze, specie di carattere immunitario.

In varie ricerche – condotte in queste condizioni – sulla attività di diversi antimicobatterici, è stato da noi notato che l'evoluzione del processo tubercolare negli animali (così inoculati ed immediatamente trattati) corrisponde in misura talvolta sovrapponibile a quella di animali, che siano stati infettati con quantità inferiori di bacilli e non trattati. Riteniamo, ora, opportuno riferire i risultati e le deduzioni di apposite ricerche, limitatamente a quelle condotte con streptomicina e con idrazide dell'acido isonicotinico (INI.). Sono stati presi in esame i principali fattori, che intervengono nelle suddette condizioni sperimentali: carica batterica massiva ed attività, dose del farmaco, nonchè inizio del trattamento.

Le cavie (peso medio 300 g) – suddivise in più lotti – sono state infettate per via inguinale con 1 mg (peso umido di germi); è stato usato un ceppo di spiccato potere patogeno e virulento, di recente isolamento (su terreno di Petragnani) sensibile *in vitro* sia alla streptomicina che all'INI. Il primo lotto di 60 cavie è servito come controllo; gli altri lotti – ciascuno di 50 animali – sono stati rispettivamente trattati per via intramuscolare con le seguenti dosi pro die di streptomicina (500 γ; 1000 γ; 2000 γ; 6000 γ) oppure d'INI. (0,5; 1; 5; 10 mg). Altri lotti di cavie (60 animali cadauno) sono stati infettati per via inguinale, con dosi inferiori di germi: $^1/_{10}$; $^1/_{100}$; $^1/_{1000}$ di mg, usando sempre il medesimo ceppo. Durante il decorso dell'infezione (ogni 10 giorni e fino al 70° giorno, sono stati sacrificati per ogni gruppo due animali, rilevando i varii elementi, che permettono di calcolare l'indice dell'impegno tubercolare (I.T.) e che corrisponde all'indice d'infezione degli altri autori. I varii elementi macroscopici, necessari per la valutazione dell'I.T. sono stati già indicati in una nota precedente[2]. Tenendo conto degli animali deceduti spontaneamente nel corso dell'esperienza, sono stati ricavati i valori relativi a T_{50} ed a T_{100}, secondo le indicazioni di Donovick *et al.*[3]. Nella seguente tabella, figurano i dati relativi a ciascun lotto di animali, riportando per brevità solo quelli finali relativi al termine dell'esperienza.

Nella valutazione dei dati, occorre prendere in esame: a) relazione tra il progredire e l'entità dell'infezione in funzione della carica bacillare; b) influenza della dose di antibiotico sul progresso ed entità dell'infezione, in seguito ad inoculazione con 1 mg.

Al 70° giorno nei controlli infettati con la dose di 1 mg, l'I.T. è al 100%, mentre in quelli infettati con carica di germi inferiore, l'I.T. è gradualmente minore. La mortalità di tutto il gruppo avviene in un lasso di tempo bene determinato, che è piuttosto limitato e costante nelle varie esperienze, pur se condotte con lotti diversi di animali. Da tutto ciò si ribadisce ancora una volta che la costanza dell'evoluzione del processo tubercolare – in funzione del tempo – si può ottenere solo inoculando gli animali con carica massiva, come già rilevato in precedenza da noi stessi[1] e da altri (Domagk[4]; Petragnani[5]; Periti e Fowst[6]).

Dall'esame, poi, dei dati relativi agli animali infettati con 1 mg e trattati, rispettivamente con streptomicina oppure con INI., si deduce che – a seconda della maggiore o minore attività delle varie sostanze, oppure della dose impiegata – i valori finali dell'Indice dell'impegno tubercolare possono corrispondere a quelli, che si rilevano nei lotti di animali infettati con quantità di germi inferiori ad 1 mg e non trattati. È ammissibile che l'immediato trattamento con un antimicobatterico in dose efficace possa determinare la riduzione della carica batterica iniziale.

Può essere, così, giustificata la proposta di valutare l'attività di un farmaco antitubercolare, in funzione della capacità di ridurre – nelle suddette condizioni d'e-

[1] C. Bazzicalupo, M. Contieri e A. Portella, Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. *28*, 119 (1952). – C. Bazzicalupo, M. Contieri e M. Gemmi, Arch. Tisiologia *5*, 1024 (1950). – C. Bazzicalupo, A. Portella, M. Contieri, Il Farmaco (ed. Scient.) *8*, 538 (1953).

[2] C. Bazzicalupo, A. Portella e M. Contieri, Il Farmaco (ed. Scient.) *8*, 538 (1953).

[3] R. Donovick *et al.*, Amer. Rev. Tuberc. *60*, 109 (1949).

[4] G. Domagk, Amer. Rev. Tuberc. *61*, 8 (1950).

[5] G. Petragnani, Minerva Medica *47*, vol. I, 1195 (1956).

[6] P. Periti e G. Fowst, Boll. Soc. It. Biol. sper. *28*, 1054 (1952).

	Indice dell'impegno tbc. al 70° giorno	T_{50} giorni	T_{100} giorni
Cavie infettate con 1 mg e non trattate	100	42	72
Cavie infettate con $^1/_{10}$ mg e non trattate	60	76	135
Cavie infettate con $^1/_{100}$ mg e non trattate	45	110	198
Cavie infettate con $^1/_{1000}$ mg e non trattate	30	126	215
Cavie infettate e trattate con streptomicina alle dosi *pro die:*			
γ 500	90	45	71
γ 1000	60	60	82
γ 2000	50	66	92
γ 6000	30	74	140
Cavie infettate con 1 mg e trattate con INI. alle dosi *pro die:*			
mg 0,5	70	59	72
mg 1	45	64	85
mg 5	40	70	90
mg 10	30	76	101

sperienza (infezione con 1 mg di germi) – al 70° giorno l'intensità dell'impegno tubercolare, ad un valore pari a quello che si può riscontrare in altri lotti di animali, in seguito ad infezione con una carica bacillare minore e non trattati. Pertanto, ogni ricercatore potrebbe allestirsi una scala di valori basata su questo criterio.

C. Bazzicalupo e A. Portella

Università di Napoli, il 31 luglio 1956.

Summary

It is reported that the data of index of tuberculous process obtained after 70 days of massive infection (with 1 mg bacilli) and immediately treated with antitubercular drug, are similar to the data observed in the guinea pig infected with a low dosage of bacilli and not treated with any antitubercular drug. The authors therefore suggest the use of this comparision for a test of the antitubercular activity of a drug.

Ricerche fisiologiche sulla distribuzione periferica del nervo depressore aortico destro nel cane

La distribuzione periferica dei nervi depressori aortici nel mammifero, quale è stata descritta dai primi anatomici (Koester e Tschermak[1]; Schumacher[2]) e riportata nella maggior parte dei moderni trattati di fisiologia, è alquanto diversa da quella illustrata nelle ricerche posteriori di Tello[3], Muratori[4] e Nonidez[5].

Secondo i primi autori, che esaminarono il decorso dei nervi di Cyon e Ludwig in degenerazione Walleriana, ambedue questi nervi si distribuirebbero a tutto l'arco dell'aorta, emettendo estese arborizzazioni sulla superficie anteriore e posteriore del vaso.

Le ricerche di Tello, Muratori e Nonidez, condotte su embrioni di mammifero e su animali neonati, avrebbero invece stabilito che mentre il depressore sinistro si spinge sino all'arco aortico ramificandosi attorno all'arteria in una ristretta zona circoscritta al punto di origine della succlavia sinistra, il depressore destro si arresta invece in massima parte alla radice dell'arteria succlavia destra e in parte minore al segmento più distale del tronco brachio-cefalico.

[1] G. Köster e A. Tschermak, Arch. Anat. Physiol., Anat. Abt. Suppl. 255 (1902).

[2] S. Schumacher, Anat. Anz. *21*, 1 (1902).

[3] J. F. Tello, Trav. labor. recherch. biol. Univ. de Madrid *22*, 295 (1924).

[4] G. Muratori, Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. *8*, 387 (1933); *9*, 1041 (1934); Arch. ital. Anat. Embriol. *36*, 387 (1937).

[5] J. F. Nonidez, Amer. J. Anat. *57*, 259 (1935); Anat. Rec. *69*, 3 (1937).

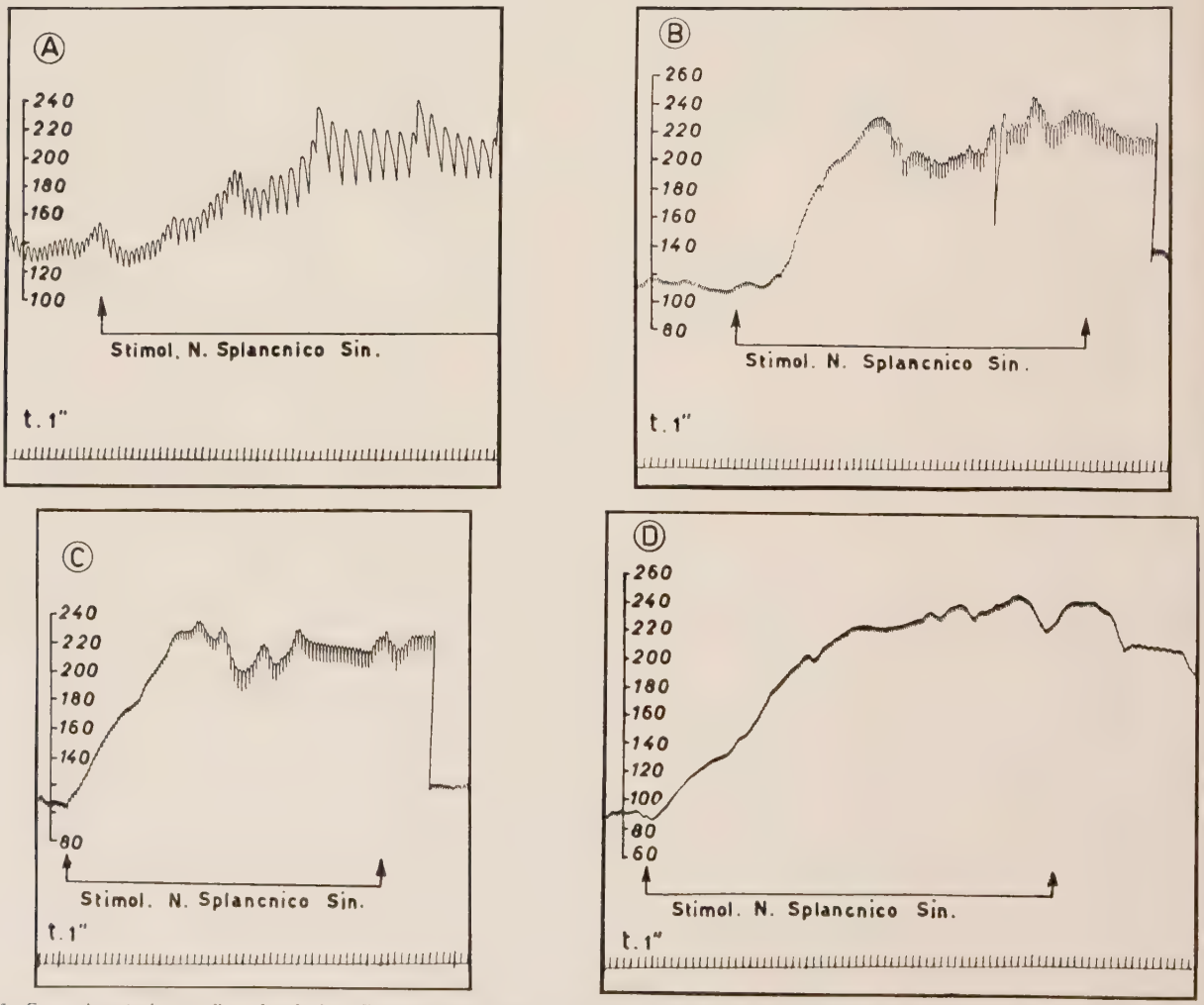


Fig. 1. Cane. Anestesia morfino-cloralosica. Registrazione della pressione arteriosa prima e durante la stimolazione elettrica del moncone periferico del n. splancnico sinistro. *A* Animale integro. *B* Dopo sezione dei due nervi di Hering e del vago-depressore sinistro. *C* Dopo denervazione dell'area barocettrice di Muratori-Nonidez. *D* Dopo sezione del nervo depressore aortico destro.

L'asimmetria della distribuzione periferica dei depressori aortici è soltanto apparente e trova la sua spiegazione, secondo Nonidez e Muratori, nel fatto che le due zone vascolari menzionate hanno una simmetrica origine embriologica, derivando ambedue dal quarto arco aortico embrionale, rispettivamente di sinistra e di destra.

Non vi è dubbio che in corrispondenza della radice dell'arteria succlavia destra esista una importante zona pressocettrice; ciò è stato dimostrato da Stella[6] in ricerche fisiologiche nelle quali vennero registrati i potenziali d'azione del depressore destro, ed è stato successivamente confermato da Green[7] in esperimenti analoghi. È da osservare però che gli impulsi afferenti dai chemocettori del corpo aortico (aortic body), situato come è noto fra l'aorta e l'arteria polmonare, percorrono non soltanto i nervi vaghi ed aortico sinistro ma anche il nervo aortico destro (Neil, Redwood e Schweitzer[8]) e possono essere rilevati nell'elettrogramma di questo nervo (Gernandt[9]).

È evidente quindi che non tutte le fibre del depressore aortico destro si arrestano all'altezza dell'arteria succlavia dello stesso lato. Resta da accertare pertanto, e questo è lo scopo della presente ricerca, se anche fibre barosensibili oltre che chemosensibili discendono al di sotto di questa zona, sino all'aorta.

A questo scopo si è esaminata la risposta cardiaca alla ipertensione arteriosa (bradicardia riflessa) in animali con i due nervi di Hering e il vago-depressore sinistro sezionati, prima e dopo la denervazione della zona pressocettrice della succlavia destra.

[6] G. Stella, J. Physiol. *87*, 78 P (1936).
[7] J. H. Green, J. Physiol. *123*, 41 P (1954).
[8] E. Neil, C. R. M. Redwood e A. Schweitzer, J. Physiol. *108*, 26 P (1949).
[9] Bo E. Gernandt, Acta physiol. Scand. *2*, Suppl. 35 (1946).

Tecnica. Gli esperimenti sono stati condotti su 10 cani, in anestesia con morfina (3 mg/kg) e cloralosio (8 mg/kg). L'ipertensione era prodotta per mezzo della stimolazione elettrica del moncone periferico del nervo splancnico sinistro o mediante somministrazione endovenosa di adrenalina (2–3 γ/kg). I due nervi di Hering erano isolati e poi recisi; ci si accertava che la stimolazione meccanica del seno carotideo mediante compressione manuale non producesse alcuna risposta dopo la sezione. Il tronco vago-depressore di sinistra era reciso. Per denervare la zona recettrice di Muratori, Nonidez e Stella, si procedeva lungo la carotide comune destra e si metteva a nudo l'arteria anonima per tutta la sua lunghezza ed il primo tratto dell'arteria succlavia sino all'origine del tronco costo-cervicale. Si scollavano quindi accuratamente detti vasi dal tessuto circostante, recidendo ogni connessione connettivale e nervosa e facendo molta attenzione a non ledere le pleure.

La pressione arteriosa era registrata alla femorale mediante manometro a mercurio; la frequenza cardiaca era misurata registrando l'elettrocardiogramma.

Risultati. Le Figure 1 e 2 illustrano i risultati ottenuti nei nostri esperimenti. In *A*, in seguito alla stimolazione elettrica del nervo splancnico sinistro nell'animale integro, si produce un notevole aumento della pressione arteriosa ed una intensa bradicardia: il ritmo sinusale diminuisce infatti da 76 a 28 impulsi al minuto con una diminuzione percentuale del 63%. Fra *A* e *B* si sezionano i due nervi di Hering ed il vago-depressore sinistro, e si scoprono le arterie anonima e succlavia destra, rispettandone l'innervazione; la pressione arteriosa, che era aumentata in seguito alla sezione dei tre nervi depressori, si riabbassa probabilmente a causa del deterioramento prodotto da quest'ultimo intervento.

In *B* si stimola nuovamente il nervo splancnico e si osserva, contemporaneamente ad un forte aumento della pressione, una diminuzione della frequenza cardiaca da

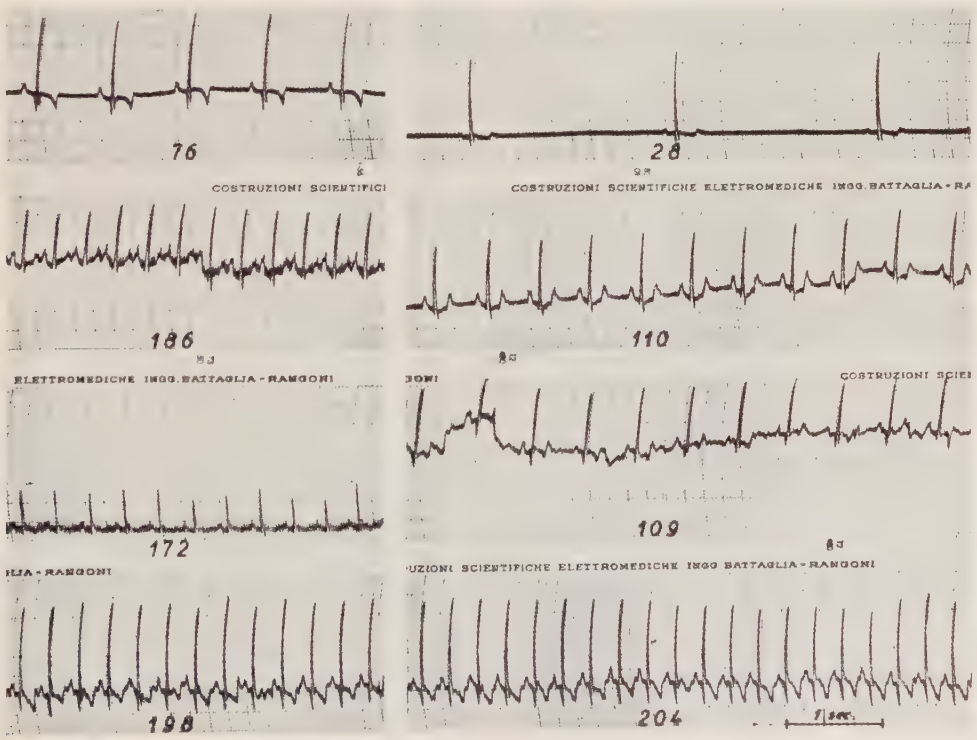


Fig. 2. Elettrocardiogramma. Medesimo esperimento illustrato nella fig. 1.

186 a 110 al min (diminuzione percentuale del 41%). Ovviamente, la bradicardia riflessa è qui meno intensa essendo state denervate le aree barocettrici carotidee e quella aortica sinistra. Fra *B* e *C* si procede alla denervazione delle arterie succlavia destra e anonima. La stimolazione del nervo splancnico produce ancora una netta diminuzione (36%) della frequenza cardiaca (*C*).

Se si stimola nuovamente questo nervo dopo avere isolato e reciso il depressore aortico destro, si produce un forte aumento della pressione arteriosa, superiore a quello delle prove precedenti, ma ora la frequenza cardiaca aumenta lievemente (*D*).

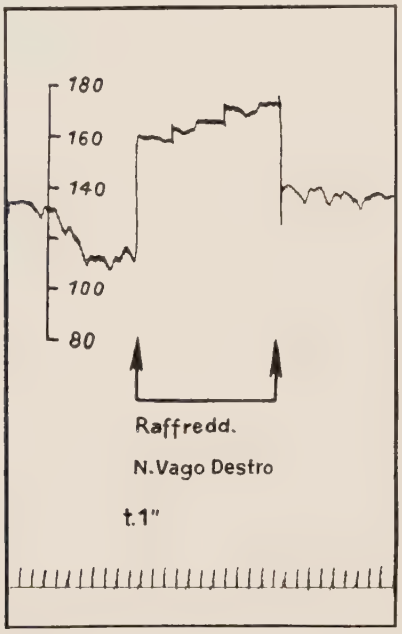


Fig. 3. Cane. Anestesia morfino-cloralosica. Registrazione della pressione arteriosa. Nervi di Hering e vago-depressore di sinistra sezionati; area barocettrice di Muratori-Nonidez denervata. Raffreddamento del vago destro.

Risultati praticamente uguali furono ottenuti elevando la pressione arteriosa mediante la somministrazione endovenosa di adrenalina.

In 6 esperimenti validi, la bradicardia riflessa prodotta dalla ipertensione in animali con il solo depressore aortico destro intatto, è diminuita del 15–45% dopo la denervazione della zona barocettrice dell'arteria succlavia destra.

Le fibre pressosensibili ancora intatte dopo tale denervazione esercitavano un'azione tonica sul centro vasomotore. Infatti, se si provocava un temporaneo blocco da freddo del vago-depressore destro mediante un termodo, la pressione arteriosa aumentava, in grado variabile nei vari animali, e ritornava ai valori di controllo riscaldando il nervo (Fig. 3).

Le presenti osservazioni portano a concludere che il depressore aortico destro è percorso da impulsi, efficaci nel controllo del ritmo cardiaco e della pressione arteriosa, i quali provengono anche da zone pressocettrici situate inferiormente a quella descritta dagli anatomici a livello dell'arteria succlavia destra, ed ubicate probabilmente nell'aorta o alla radice dell'arteria anonima.

O. Pinotti e F. Bruno

Istituto di Fisiologia Umana della Università di Parma, Italia, il 11 ottobre 1956.

Summary

The periferal distribution of the right aortic nerve has been studied in physiological experiments on the dog. It has been found that after section of both Hering's nerves and left vago-depressor trunk and after denervation of the baroceptor area of Muratori-Nonidez lying at the root of the right subclavian artery, the electrical stimulation of one splancnic nerve or the intravenous injection of adrenaline still produces a reflex bradycardia; moreover the cooling of the vagus nerve still results in a rise of the blood pressure. It is inferred that a group of baroceptor fibres of the right aortic nerve originate from areas situated in the aortic region.

PRO LABORATORIO

An Adaptor for the Beckman Spectrophotometer for the Reading of Chromatograms and Electropherograms

The need for quantitative evaluation of spots and bands on paper chromatograms by the spectrophotometric determination of their optical density at a chosen wavelength induced us to develop an adaptor applicable to the Beckman spectrophotometer. The apparatus which was developed is shown in Figure 1.

In the place of the cell compartment of the spectrophotometer, we substitute a brass box 9·5 × 10 × 14·5 cm which is supported by three rods.

The box is inserted between the cell compartment mounting block and the phototube housing by four long screws.

In the wall adjacent to the mounting block, there is a circular hole, exactly superimposed with the opening for the exit of the light beam. On the opposite wall near the phototube, an adjustable vertical slit, 32 mm high, is located centrally.

The light beam from the spectrophotometer is collimated into a narrow vertical band and is focused on the slit by means of two cylindrical lenses 17 mm in diameter.

The first lens is horizontally placed just behind the light entrance hole; the second lens is held in a vertical position in front of the slit.

Two opposite vertical apertures are provided on the anterior and posterior walls for the slide-mechanism which carries the paper strip to be read. The slide-mechanism rides on two steel guides in the space between the vertical lens and the slit, and carries an outer arm to which a graduated plexiglas rule, 20 cm long, is fixed at a right angle. The rule is used in conjunction with a small table which is connected to the apparatus after the apparatus has been completely mounted.

The upper surface of the outer arm of the slide bears a millimeter scale, and, on the adjacent border of the small table, a reference line is drawn which corresponds to the position of the slit.

The slide is made solidly of steel to assure its rigidity; it is made 50 cm long to permit the changing of the paper strips without removing the slide. The slide has a central rectangular opening, 32 × 200 mm, in which the paper is mounted between two removable glass plates which are held securely by two snap springs.

The paper strip is mounted in the slide, and the position of the blank region of the paper strip is located by means of the millimetre scale on the upper arm. This blank reading, in millimetres, is made to coincide with the reference line on the border of the small table. Then the spectrophotometer is set at the desired wavelength

and is operated as usual for optical density measurements. The slit width and the phototube sensitivity are then adjusted to give a zero setting on the metre needle. The slide is then slowly moved forwards and the optical densities readings at the different sections of the strip are determined. The values read are recorded on a sheet of paper (which is fixed on the small table) with the aid of the graduated rule which moves together with the

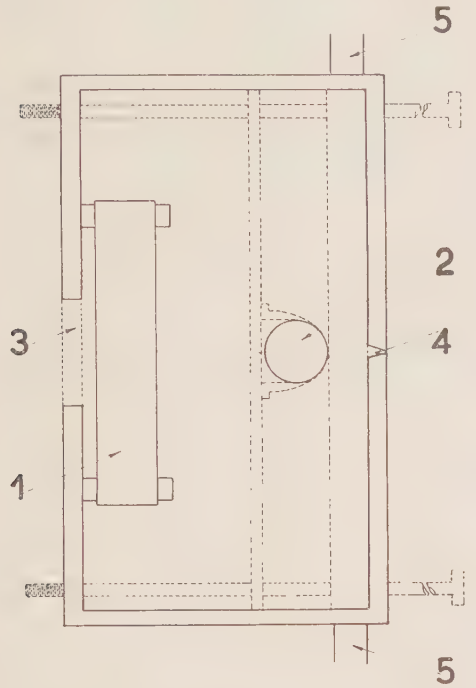


Fig. 1 *a*. — Horizontal section. *1* horizontal lens; *2* vertical lens; *3* light entrance hole; *4* slit; *5* slide-mechanism.

slide. The readings are continued until the blank region of the other end of the paper strip is reached. A strip 12–15 cm long is read in about 10 min. During this time, no variations of the zero value occur, and thus a correct base line is obtained.

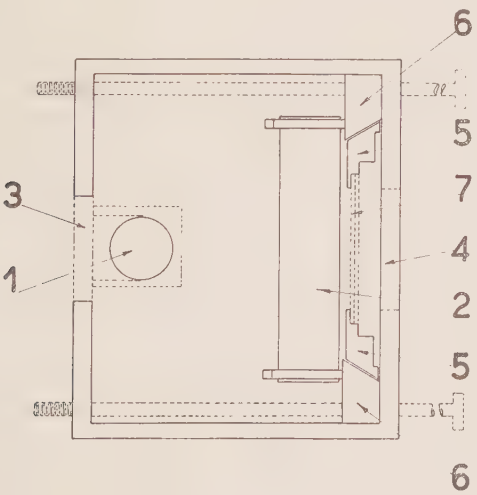


Fig. 1 *b*. — Cross section. *1* horizontal lens; *2* vertical lens; *3* light entrance hole; *4* slit; *5* slide-mechanism; *6* guides for the slide-mechanism; *7* glass plates and paper strip.

By connecting the points marked on the paper, a curve is obtained whose maxima correspond exactly to the centre of the bands; this facilitates the planimetric measurements, and permit a direct comparison of the curve with the strip. The areas subtended by the curve are directly proportional to the amount of the substance under examination. The narrowness of the slit allows good resolution of very close bands. Since the readings are made at an optimal wavelength, very weakly stained areas may be determined. It has been found that the Beer-Lambert law is followed in the various colour reactions used.

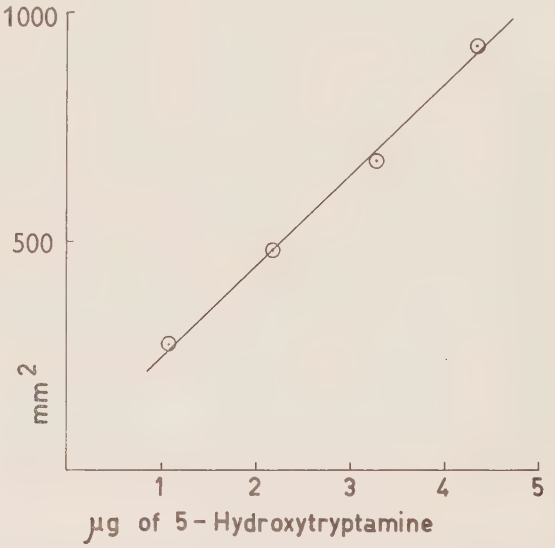


Fig. 2. — Standard curve for 5-hydroxytryptamine. The amount of the substance on the electrophoretic strips is plotted against the planimetric readings. Reaction with α-nitroso-β-naphthol according to UDENFRIEND *et al.*[1].

Among many other applications, the apparatus has been used, for instance, for determination of 5-hydroxytryptamine after electrophoresis on filter paper, with acetate buffer at pH 4·0, μ 0·1 (Fig. 2). The colour was developed by the α-nitroso-β-naphthol-reaction, according to UDENFRIEND *et al.*[1] ;after the reaction, the excess reagent was extracted from the strips by dichloroethylene, leaving a perfectly white background; readings were performed at 545 mμ. As it appears from the curve, a linear relationship exists between the amount of 5-hydroxytryptamine and the planimetric readings. The standard deviation is $\pm$ 5%, that is in the order of that usually found for common colorimetric methods. The sensitivity is very high because a total of 1 μg of 5-hydroxytryptamine may be reliably determined.

G. CERIOTTI

Centre for the Study and Cure of Tumours, Busto Arsizio (Italy), August 8, 1956.

Riassunto

Viene descritto un accessorio applicabile allo spettrofotometro di BECKMAN per la lettura di cromatogrammi e di elettroferogrammi. La luce proveniente dallo spettrofotometro viene trasformata, per mezzo di due lenti cilindriche, in una lunga e stretta banda che permette di risolvere anche righe tra loro vicine. Le letture possono essere praticate alla lunghezza d'onda desiderata. Esiste in tali condizioni una relazione diretta tra la quantità di sostanza in esame e l'area sottesa dalla curva ottenuta ponendo in grafico i valori di densità ottica nei vari punti della striscia in esame.

[1] S. UDENFRIEND, H. WEISSBACH, and C. T. CLARK, J. biol. Chem. *215*, 337 (1955).

PRO LABORATORIO

Beschreibung eines Gewebeschneiders zur Herstellung überlebender Gewebescheiben

Das Studium von Stoffwechselvorgängen *in vitro* mit überlebenden Gewebescheiben ist immer an Reihenversuche gebunden und an die statistische Auswertung der Ergebnisse. Je grösser nun die Reihen sind und je ähnlicher deren Einzelversuche untereinander, desto einwandfreier ist es, den statistisch errechneten Mittelwert als charakteristisches Ergebnis des Versuchs zu bezeichnen. Da nun in den meisten Fällen der Grösse der Reihen enge Grenzen gezogen sind, ist es besonders wichtig, dass die Einzelversuche untereinander so ähnlich wie möglich sind.

Um das zu erreichen und somit die *in vitro* erhaltenen Ergebnisse auf die Vorgänge im gesamten Organismus übertragen zu können, sind folgende Bedingungen von grundlegender Bedeutung:

1. Die Zeitspanne zwischen dem Tod des Versuchstieres und dem Anfang des zu messenden Vorganges soll so kurz wie möglich sein.
2. Jede Gewebescheibe für sich, ebenso wie die Gewebescheiben derselben Serie, sollen eine bestimmte gleichmässige Dicke aufweisen[1].

Um diesen beiden Geboten gerecht zu werden, sind eine Anzahl von Verfahren im Gebrauch, die mehr oder weniger stark von der Geschicklichkeit des Ausführenden abhängig sind. Sei es, dass man eine Rasierklinge benutzt oder ein Instrument, wie das von Stadie und Riggs[2] vorgeschlagene, immer wird man eine grössere Anzahl Gewebescheiben schneiden müssen, um unter ihnen die für die Versuchsreihe geeignetsten auszulesen.

Das im folgenden beschriebene Instrument[3] hat den Vorteil, diesen zeitraubenden Vorgang abzukürzen und ihn von der Geschicklichkeit des Ausführenden weitgehend unabhängig zu machen. 10 Rasierklingen werden durch Trennblätter (aus rostfreiem Material) bestimmter Dicke in gleichem Abstand gehalten und auf die im Bild ersichtliche Art mit einem Griff verbunden, wobei darauf zu achten ist, dass die Schneiden absolut in einer Ebene liegen. Diese Anordnung erlaubt, mit einer einzigen Schnittbewegung 9 Gewebescheiben zu erhalten, deren Dicken im Durchschnitt um nicht mehr als 10% schwanken.

Zur Anfertigung von Rattenleberschnitten verfährt man folgendermassen: Auf einen Korkstopfen von etwa 3 cm Höhe und 7 cm Durchmesser legt man einen Leberlappen, den man mit Zeige- und Mittelfinger der linken Hand leicht an den Kork drückt. Das in der rechten Hand gehaltene Instrument wird jetzt derart auf den Leberlappen gesenkt, dass die der rechten Hand zugewandte Schneidenhälfte etwa auf den höchsten Punkt der natürlichen Lappenwölbung zu liegen kommt. Nun wird in einer einzigen Schnittführung, deren Verlauf die Resultierende einer senkrechten und waagrechten Bewegung ist, der Leberlappen zerschnitten. (Es ist unerlässlich, das zu schneidende Gewebe, wie auch die Klingen, vor dem Schnitt ausgiebig mit eiskalter Flüssigkeit zu befeuchten.) Während des Schneidens achte man darauf, dass die Klingen senkrecht zur Unterlage gerichtet sind.

Hat man am Ende der Schnittbewegung einen leichten Druck gegen den Kork ausgeübt, so stecken die getrennten Gewebescheiben zwischen den Klingen, von wo sie leicht und unbeschädigt entfernt werden können, wenn man die gebogenen Spitzen einer der in der Augenchirurgie verwendeten Pinzetten längs der Trennblätter zwischen die Klingen führt. Hat man aber am Ende der Schnittbewegung nicht besonders auf die Unterlage gedrückt, dann bleiben die Gewebescheiben am äussersten Rand verbunden und können also leicht mit der Pinzette entfernt werden, ohne die Schneiden zu berühren. Sie werden dann mit einem einzigen Scherenschnitt längs der zusammenhängenden Ränder auf einmal getrennt.

Man erhält auf die eine oder andere Weise in kürzester Zeit 9 Gewebescheiben, die immer sehr gleichmässig ausfallen.

Nach Fuhrman und Field[4] liegt die günstigste Dicke der Rattenleberscheiben für metabolische Versuche im Warburgschen Apparat zwischen 0,48 und 0,62 mm. Benutzt man zwei Trennblätter (eins von 0,2 mm und eins von 0,3 mm Dicke) zwischen den Rasierklingen, so wird man Scheiben erhalten, deren Dicke einige Hundertstelmillimeter um 0,5 mm schwankt und für diese Art von Experimenten äusserst günstig sind.

Ein typisches Beispiel[5] für in der beschriebenen Weise angefertigte Schnitte und ihre Atmung ist folgendes Experiment:

Sauerstoffverbrauch von Rattenleberschnitten
Substrat: Glukose. Klingenabstand 0,5 mm.
Vom Tod des Tieres bis zum Anfang der Messung verstrichen 14 min.

Gefäss Nr.	Gefäss-konstante	Korrigierte Manometer-ablesung	Trockenes Gewebe mg	Q_{O_2}
2	1,15	103	12,8	9,26
155	1,20	109	14,1	9,28
4	1,12	108	13,7	8,84
173	1,07	93	10,5	9,48
2	1,13	110	13,0	9,56

[1] J. Field, *Methods of medical research* (The Yearbook Publishers Inc., Chicago 1948), vol. 1, p. 289.

[2] W. C. Stadie und B. C. Riggs, J. biol. Chem. *154*, 687 (1944).

[3] Die Firma B. Braun, Melsungen, Deutschland, hat die Herstellung übernommen.

[4] F. A. Fuhrman und J. Field, Arch. Biochem. *6*, 337 (1945).

[5] Dieses Beispiel wurde von Herrn Dr. E. Figueroa gegeben, dem ich dafür zu Dank verpflichtet bin.

Eine grössere Anzahl Trennblätter von 0,2 mm und 0,3 mm Dicke bieten grösste Variationsmöglichkeiten.

W. Hülsen

Institut für physiologische Chemie und Pathologie, Medizinische Fakultät der Universität Chile, Santiago, den 31. Juli 1956.

Summary

A simple tissue-slicer is described. It consists of 10 razorblades mounted in a handle. Details are given how to obtain, with one cut, 9 very similar tissue slices.

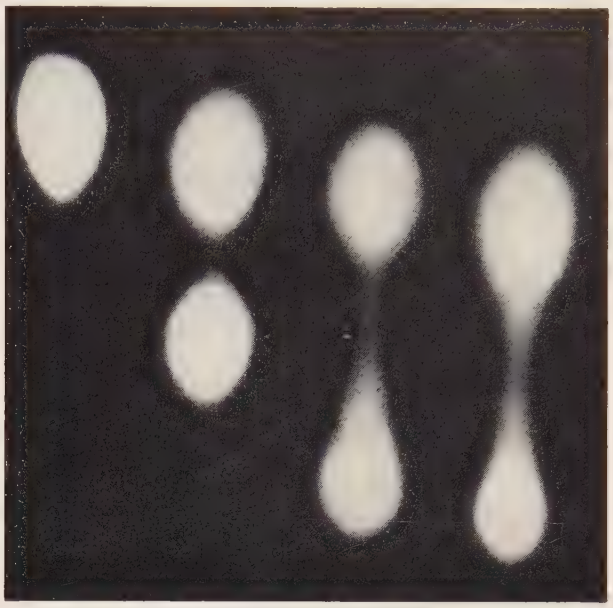
PRO EXPERIMENTIS

A New Method for Visualizing and Recording Photographically Bioautograms

Working with bioautograms of different forms of cobalamins, especially in liver extracts, obtained by a modification of Kocher's method[1] (agar plates with *Escherichia coli* 113/3, paper strips applied on the surface for exactly 3 min), difficulties were encountered in the visual observation and photographical record of the zones of exhibition. Looking for a method that did not require the addition of any substance (such as 2:3:5-triphenyl tetrazolium chloride and related compounds)[2] to the agar before incubation, a number of reactions used to demonstrate peroxidatic activity were tried.

Positive results were obtained, with the appearance of coloured zones corresponding to the sites of growth of *E. coli* 113/3, by pouring on the surface of the agar plates after incubation one of the following reagents: pyrogallol, *p*-phenylenediamine · HCl (both 5% w/v in distilled water), hydroquinone (5% w/v in NaOH 0·1 *N*), and a mixture 1:1 of α-naphtol and dimethyl-*p*-phenylenediamine · HCl (both 1% w/v), followed by water rinsing and the addition of hydrogen peroxide (1% w/v).

The best results were obtained with *p*-phenylenediamine · HCl. 5 g of *p*-phenylenediamine · HCl are dissolved in 100 ml of distilled water, a little charcoal is added and the solution passed through filter paper. The clear solution is immediately poured on the surface of the agar plate (about 50–60 ml for a plate 31 × 22 cm): after 3 min it is washed away with two-three changes of distilled water and 50–60 ml of hydrogen peroxide (1% w/v) are added.



Photostatic copy of the paper chromatograms of cyanocobalamin, and three different natural liver extracts (from left to right). Development of the bioautogram with *p*-phenylenediamine · HCl.

In 2–3 min well defined zones with a violet-black colour appear. The hydrogen peroxide solution is washed away and the agar surface is two–three times rinsed with distilled water. Photographic records have to be taken in a few minutes, as a dark background colour soon developes which makes a sharp distinction of the zones of exhibition difficult.

With hydroquinone solutions, used in a similar way, although the zones of growth show a lighter brownish colour, the background does not disturb the photographic records for a few hours.

A. Cresseri and
A. Spelta (technical assistant)

Biological Laboratory, Istituto 'Carlo Erba' per Ricerche Terapeutiche, Milano (Italy), July 30, 1956.

Riassunto

Viene rapidamente descritto un nuovo metodo per lo sviluppo e la fotografia di bioautogrammi su piatta d'agar con *Escherichia coli* 113/3.

[1] V. Kocher, Int. Z. Vitaminf. *26*, 321 (1956).
[2] J. E. Ford and E. S. Holdsworth, Biochem. J. *53*, xxii (1953).

Informations - Informationen - Informazioni - Notes

COGITATIONES

The Interpretation of Genetical Data

Six assumptions are commonly made in the calculation of linkage relations: (a) That the gene is stable in the heterozygous condition. (b) That crossing-over in the 4-strand stage is at random (chromatid interference does not occur and the frequency of 2-: 3-: 4-strand double exchanges is 1:2:1). (c) That a low frequency of recombination indicates a low frequency of crossing-over. (d) That positive chromosomal interference occurs (one cross-over inhibits crossing-over in an adjacent region of the same chromosome). (e) That the centromeres segregate at random. (f) That crossing-over on one chromosome is independent of crossing-over on any other chromosome. It is the purpose of this communication to point out that these assumptions usually are made implicitly rather than explicitly, and since their validity is in question it may be advisable (until the present confusion has been clarified) to state explicitly the assumptions which are made in any given calculation.

The assumption (a) that the gene is stable is contradicted by the work of Lindegren[1] and others[2] who have reported numerous instances in which genes in the heterozygous condition undergo 'conversion'. Lindegren and Lindegren[3] have recently shown that this may may be due to the irregular distribution of the nutrilites required to construct nucleic acids. The analysis by Lindegren and Lindegren[4] of chromatid and chromosomal interference in Neurospora revealed that chromatid interference (deviation from 1:2:1 ratio of 2-:3-:4-strand double exchanges) occurs, invalidating assumption (b). The most frequent type of double exchange was the 2-strand double, making the relation between the frequency of recombination and crossing-over obscure since a high frequency of 2-strand double exchange makes a low frequency of recombination not inconsistent with a high frequency of crossing-over, invalidating assumption (c). The high frequency of multiple exchanges found by Lindegren and Lindegren indicates that chromosomal interference is negative rather than positive across the centromere (simultaneous adjacent 2-strand double exchanges occur much more frequently than would be expected), contrary to assumption (d). Since yeast centromeres segregate preferentially[5], it is improper to assume, as in (e), that the centromeres assort at random. Schultz and Redfield[6] showed that interchromosomal 'coincidence' may differ significantly from unity[7]. Recent findings[8] indicate that inferences involving assumptions of independence of crossing-over between different chromosomes need to be reevaluated (f).

Testing for Significance. In testing a statistical hypothesis (for example, in testing for significant deviation from a 1:2:1 ratio among 2-:3-: and 4-strand double exchanges), two possibilities of error are involved: (α) the acceptance of a false hypothesis and (β) the rejection of the correct hypothesis, just as the two errors of a murder trial may be (α) hanging an innocent man or (β) the release of a murderer. In testing for chromatid interference, the statistical hypothesis being tested is the proposition that double exchanges are proportioned according to a 1:2:1 ratio. The χ^2 test yields the probability P (or $1-p$) that the accepted hypothesis is false

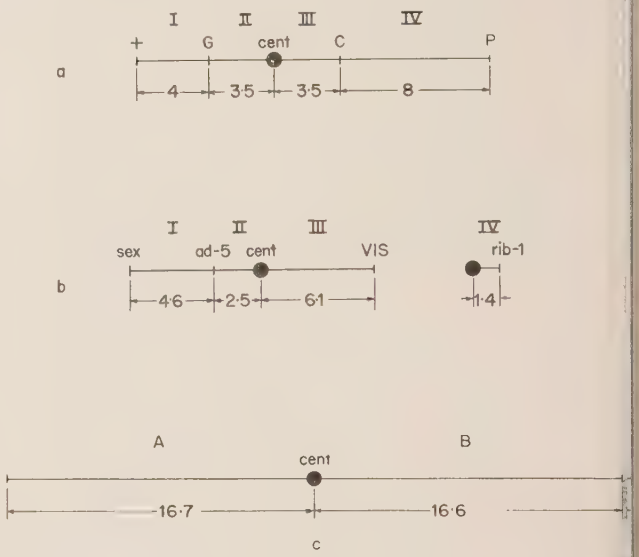


Fig. 1. — Maps of *Neurospora* chromosomes over regions analyzed for chromatid interference (*a*) by Lindegren and Lindegren[4], (*b*) by Howe[13], and (*c*) by David Stadler[14]. The maps are drawn to scale in centimorgans.

Data showing a significant deviation from a random proportion of double exchanges[9] means that it is quite likely that the hypothesis of random exchange is false on condition that the hypothesis was accepted. Other distributions of double exchanges which do not deviate from a random proportion[10] show that the probability of accepting a false hypothesis of random double exchange is not so high with regard to the latter distributions. It has been customary to assume that these data constitute a refutation of Lindegren and Lindegren's conclusion that double exchanges do not occur randomly. However, to accomplish a logical refutation it is necessary to compute the probability (β) that Lindegren and Lindegren had rejected a true hypothesis (not that they had somehow accepted a false hypothesis). Computation of β involves the prior knowledge of the *actual* proportion of double exchanges in a population so that β represents the probability of rejection of the hypothesis on the basis of specific data (population sample). Since knowledge of this kind is not available before sample data have been collected, such a computation cannot be performed.

Chromatid Interference in Neurospora. Lindegren and Lindegren concluded that locally specific patterns of chromatid interference are characteristic for different pairs of regions (Fig. 1*a*) and that an excess of 2-strand

[1] C. C. Lindegren, Science *121*, 605 (1955).

[2] B. D. Mundkur, Ann. Mo. Bot. Gar. *36*, 259 (1949). – P. St. Lawrence, P.N.A.S. *42*, 189 (1956). – M. B. Mitchell, P.N.A.S. *41*, 215 (1955); *41*, 935 (1955).

[3] C. C. Lindegren and G. Lindegren, Nature *178*, 796 (1956).

[4] C. C. Lindegren and G. Lindegren, Genetics *27*, 1 (1942).

[5] C. C. Lindegren and E. E. Shult, Exper. *12*, 177 (1956).

[6] J. Schultz and H. Redfield, Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. *16*, 175 (1951).

[7] E. E. Shult and C. C. Lindegren, Nature *175*, 507 (1955).

[8] D. Mazia, P.N.A.S. *40*, 521 (1954). – D. Steffensen, Abs., Genetics Society of America, East Lansing, Mich. (1955). – R. P. Levine, P.N.A.S. *41*, 727 (1955).

[9] C. C. Lindegren and G. Lindegren, Genetics *27*, 1 (1942). – C. L. Huskins and H. B. Newcombe, Genetics *26*, 101 (1941).

[10] G. W. Beadle and S. H. Emerson, Genetics *20*, 192 (1935). – D. R. Stadler, Science *122*, 878 (1955).

double exchanges occurs in regions symmetrically placed across the centromere. To quote from their paper: 'Either overlapping of the spindles or equational division of the

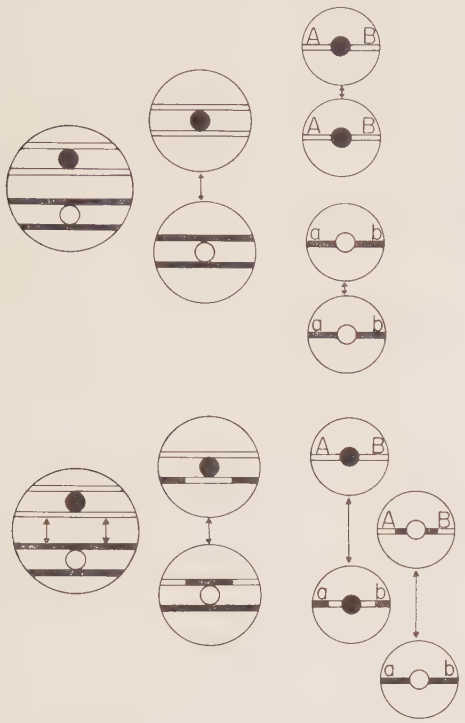


Fig. 2. – If misassortment occurs 'more frequently in double exchange bivalents than on others', as PERKINS assumed, most 2-strand double exchanges in regions II and III would be undetected, since the orientation of the spores would be the same in a 2-strand double which had misassorted as in a non-cross-over. Simultaneous second division segregation of the genes bounding regions II and III would occur only when either misassortment or 2-strand double exchange occurred alone, both classes being assumed by PERKINS to be relatively rare in comparison with the class in which both events occurred concomitantly. On PERKINS' assumption the observed number of simultaneous second division segregations of genes in regions II and III (which were interpreted by LINDEGREN and LINDEGREN as 2-strand double exchanges in regions II and III) are usually either misassortments or 2-strand double exchanges and most of the 2-strand doubles are concealed by misassortment. He was obviously unaware of this consequence of his hypothesis since it greatly increases the frequency of 2-strand doubles in regions II and III over the observed ratio of 20:3:1 of 2-:3-:4-strand double exchanges and it was *this* deviation from randomness that he was really trying to reduce.

centromere at the first meiotic division would produce an arrangement of spores in the ascus interpreted as a 2-strand double exchange in regions II and III. Therefore, this particular type of exchange has alternative interpretations. If the asci were reclassified and the arrangements interpreted as 2-strand double exchanges in regions II and III were *reinterpreted* as overlapping of the spindles... 4 of the 13 cases of overlapping or equational separation of the centromere at metaphase I occur among the 28 double exchange asci. This is an extremely improbable distribution as the χ^2 test shows, and we may conclude that either the before-mentioned arrangements are not due to overlapping or equational separation of the centromere at metaphase I, or we are forced to take the highly improbable view that overlapping or equational centromere separation usually occurs coincidentally with a double exchange in regions I and IV... There is no *a priori* reason why equational division of the centromere at metaphase I or spindle overlapping should occur coincidentally with crossing-over. In fact, it is a reasonable assumption that misassortment occurs independently of crossing-over.' PERKINS[11] chose one of the alternatives, stating that *'misassortment must be assumed to occur more frequently in double-exchange bivalents than in others...* in order to account for observed frequencies of apparent quadruples.' The consequences of this assumption are shown in Figure 2. A double exchange occurring in regions II and III coincidental with misassortment would be an apparent non-cross-over tetrad although crossing-over had actually occurred. PERKINS failed to consider these in his recalculation. He did not realize that although his assumption reduces the number of calculated quadruple exchanges it increases the number of 2-strand double exchanges in regions II and III above the ratio of 20:3:1 of 2-:3-:4-strand double exchanges. We have chosen to assume that *misassortment, if it occurs at all, is independent of crossing-over.*

The excess of 2-strand double exchanges found by LINDEGREN and LINDEGREN between regions I and IV are independent of interpretations involving misassortment of the centromere since two markers adjacent to the centromere define the events occurring in regions II and III irrespective of misassortment of the centromeres. The ratio of 2-:3-:4-strand double exchanges between regions I and IV was 15:7:6. In the discussion following Dr. PERKINS' paper [11], Dr. LINDEGREN pointed out that 'Since the p values (by χ^2) for regions I–IV and II–IV, based on PERKINS' recalculated data, are 0·025 and 0·0001, respectively, the evidence for chromatid interference is as positive on the hypothesis of misassortment of the centromere as on the hypothesis that the centromere segregates regularly at meiosis I.' PERKINS admitted, 'It is true that two or three deviations' (from a total of six!) 'that indicate chromatid interference still remain...' (after recomputation of the data on the hypothesis of misassortment of the centromeres), thus establishing the nonrandomness of the events occurring between regions I–IV and II–IV by his own calculations.

PERKINS' assumption of a 1 per cent frequency of misassortment is in conflict with the available cytological data. DODGE[12] in an extensive cytological investigation of *N. sitophila*, did not find any overlapping spindles and noted a partition of vacuoles in the cytoplasm of the ascus at the four-nucleate stage effectively separating the nuclei and preventing change of position. LINDEGREN (unpublished) had a similar experience with *N. crassa*. In *N. tetrasperma*, DODGE had described the overlapping of the spindles (which is easy to identify because the central bodies remain attached to the nuclei after telophase) to occur regularly in every ascus. The attached central body makes it possible to distinguish the orientation of the spindles even after the spindles themselves have disappeared.

LINDEGREN and LINDEGREN (Table I) showed that the distribution of 2-:3-:4-strand double exchanges for regions I–IV, II–IV and III–IV each differ significantly from a 1:2:1 ratio and from each other. If PERKIN's correction were valid and were applied (see above) the ratio of 20:3:1 in regions II–III would diverge even more from 1:2:1 ratio. These data prove that chromatid interference is locally specific for any given pair of regions and that it is not permissable to lump data from different pairs of regions. In spite of this, HOWE[13] has

[11] D. D. PERKINS, *Symposium of Genetic Recombination* (Oak Ridge, Tenn., April 1954), p. 119.

[12] B. O. DODGE, J. agr. Res. *35*, 289 (1927).

[13] H. B. HOWE, Jr., Abs., Records of the Genetics Society of America (1954), p. 45.

Table I.—Lindegren and Lindegren's Data.

	I and II	I and III	I and IV	II and III	II and IV	III and IV
2-strand	1	2	15	20	0	0
3-strand	2	4	7	3	0	8
4-strand	3	1	6	1	5	5
2- or 4-strand	6					2
2- or 3- or 4-strand			1			
2-:3-:4-	1:2:3	2:4:1	15:7:6	20:3:1	0:0:5	0:8:5

lumped data involving three pairs of regions on the same chromosome studied by Lindegren and Lindegren (Fig. 1*b*) and presented the summation of these data (Table II) as evidence for random distribution of 2-:3-:4-strand double exchanges. He arbitrarily "corrected" the data on the assumption that crossing-over on a given chromosome is independent of crossing-over on any other chromosome. The data from his regions I–II and II–III are not significant, and since it is not permissable to lump data, only the 3:8:1 distribution for region I–III may be considered. There seems to be no point in publication of this information since the conclusion is unsupported by the data. This criticism disregards both the validity of his arguments for "correcting" his data and the obvious difficulties he encountered in dissection. He records 55 cases of translocated spores. Considering the fact that most transpositions are undetectable in non exchange tetrads these errors were accumulated in about 300 tetrads. This can only mean either (*a*) that his technique was not adequate or (*b*) that the spores were much smaller than the ascus, since gross aberrations of this kind were never encountered by Lindegren and Lindegren.

Table II.—Howe's Data. Regions

	I–II	I–III	II–III
2-strand	0	3	2
3-strand	1	8	2
4-strand	1	1	2

Randomization of Nonrandom Data. David Stadler[14] analyzed the effects of segregation of two spore markers located, respectively, 16·7 and 16·6 units on opposite sides of the same centromere (Fig. 1*c*). Even if his data involved the chromosome studied by Lindegren and Lindegren, Stadler's markers are so far from the centromere that the effects of crossing-over would be randomized over the regions described by him, concealing the nonrandom events which Lindegren and Lindegren demonstrated to occur across the centromere. Stadler concluded that his observations 'failed to confirm the observations of Lindegren and Lindegren'. The negative evidence presented by Stadler over a single large region is not pertinent to the significance of the positive nonrandom data presented by Lindegren and Lindegren over four, short, well-marked regions (Fig. 1*a*). Stadler's inability to recover all chromatids due to inviability further reduced the significance of his conclusions. There is no point in Stadler's statement that his data are 'in good agreement' with those of Howe, since Howe's data are too scanty to show significant deviation from either the nonrandom data of Lindegren or the randomized data of Stadler; Howe's data are significant only with regard to the interdependence of crossing-over between heterologous chromosomes.

Somatic Crossing-Over. Stern's[15] demonstration of somatic crossing-over was based on two assumptions: (a) That the gene is stable in the heterozygote and (b) that, if gene-conversion occurs, it is unlikely that linked genes would undergo conversion concurrently. Lindegren[3] has shown recently, however, that linked genes do, in fact, tend to undergo conversion concurrently. It may be necessary to reevaluate inferences based on assumptions concerning somatic crossing-over.

This work was supported by research grants C-1179 and C-2140 from the National Cancer Institute of the National Institutes of Health, Public Health Service.

C. C. Lindegren and E. E. Shult

Biological Research Laboratory, Southern Illinois University, Carbondale, June 28, 1956.

Note added in proof. A recent paper by Stadler[16] expanding the information cited above claims to present further data "in complete agreement with those of Howe", but points out that "Howe's experiment involved short map regions"... and "because the numbers are small the result is compatible with quite a wide range of ratios of the three types".

Stadler's analysis of both chromosomal and chromatid interference in 3-point half-tetrad data assumes that both types of 3-strand doubles occur with equal frequency. If the one type of 3-strand double in his sample preponderates excessively over the reciprocal type, it is possible that his ratio of 43:54:33 is nearly a 1:1:1 ratio even when chromatid interference (in the form of an excess or deficiency of 3-strand double exchanges) is present. Critical evidence on this subject is not available from *Neurospora* data, although the indications from Table I[4] suggests that it may not be a permissible assumption. Unpublished data from yeast genetics show 14:2 and 8:1 ratios for the two types of 3-strand doubles indicating that they do not always occur with equal frequency. In half tetrad data, involving 2 loci and a centromere, Stadler's conclusions that chromosomal interference is absent and that chromatid interference is absent (so that his data do not require Whitehouse's correction) rest on the more general assumption that 3-strand double exchange comprises one-half of the double exchanges. Since much of Stadler's analysis depends upon these assumptions, his inferences concerning the absence of chromatid interference are prejudicated.

Stadler points out that "double crossovers involving regions I and III" (in the material studied by him) "would not be affected by meiotic nuclear passing".... (since)... "such an event would be scored double crossing over involving regions I and II". In comments on Lindegren and Lindegren[4], Stadler states that "they reported

[14] D. R. Stadler, Science *122*, 878 (1955).

[15] C. Stern, Biol. Zbl. *51*, 547 (1931).

[16] D. R. Stadler, Genetics *41*, 623 (1956).

that among the double crossovers involving regions in opposite chromosomes arms, the majority involved only two strands. Recent work has not confirmed this report of an excess of 2-strand double crossovers." LINDEGREN and LINDEGREN pointed out that the ratio of 2-:3-:4-strand double exchanges occurring in regions I and IV analyzed by them were independent of events occurring in regions II and III, and it is clear that STADLER understands the significance of this statement by the quote above. Between regions I and IV, LINDEGREN and LINDEGREN reported a frequency of 15:7:6 of 2-:3-:4-strand double exchanges making STADLER's comments on the absence of evidence for chromatid interference described by LINDEGREN and LINDEGREN incomprehensible.

Throughout his discussion, STADLER has failed to discriminate between recombination and crossing-over. Since it is obvious that undetected multiple exchanges must be involved, WHITEHOUSE's correction must be applied before any conclusive interpretation can be drawn from his data.

Zusammenfassung

Für die Interpretation genetischer Ergebnisse wird den Autoren vorgeschlagen, Grundannahmen jeweils ausführlich zu formulieren.

STUDIORUM PROGRESSUS

The Use of Radioactive Bands in Tracing Hibernating Bats

By A. PUNT and P. J. VAN NIEUWENHOVEN[1]

Introduction.—In the southern part of the province of Limburg (the Netherlands) a number of caves are found, which are formed by excavating the limestone for building purposes. These caves provide an ideal shelter to hibernating bats. Hundreds of bats of 11 species can be found in these large labyrinths during the winter and it is clear that Dutch zoologists have studied physiological, ecological and ethological problems concerning bat hibernation (BELS[2]; SLUITER *et al.*[3]; DE WILDE and VAN NIEUWENHOVEN[4]).

When bat behaviour during the winter was studied some difficulties were met, which were not easy to overcome. The aim of this paper is to point out a method to deal with one of these problems and to report some results recently obtained by using this method.

As is generally assumed bats do not remain asleep for the whole winter season but get awake periodically. DE WILDE and VAN NIEUWENHOVEN tried to determine the mean duration of the sleep-period which was estimated to be a few weeks. They also studied the migration of hibernating bats, depending on this fact. They found that especially in the second half of the winter animals, being marked with aluminium bands disappeared from the cave and that new bats, without bands, appeared. It may be noticed, that this winter migration could have been forwarded by the act of banding itself, which may alarm the animals considerably. But the appearance of bats without bands, which probably never had been handled, was considered to be natural behaviour.

So it was very likely that local migration, from one cave to another took place during the winter, which was in accordance with observations of FOLK[5], ANCIAUX[6], VERSCHUREN[7], and KOWALSKI[8].

Much bats are hibernating in fissures of the rocky walls of the cave and they may enter into these crevices so far, that they cannot be detected visually. Now the disappearance of banded bats and the appearance of unbanded ones could also be explained by displacements of animals to and from this invisible bat-reservoir. So there are two possible explanations for the change in population of a cave: local-migration to and from other caves and movements within the cave to and from unaccessable fissures in the rock. In order to determine which of the two possibilities was the most likely, we provided bands with radioactive material, which made it possible to trace the animals even when they were quite invisible.

Methods.—Bands of the usual size (width 4 mm, weight 120 mg) were made of aluminium and stamped with a number. One of the ends was lengthened and folded back to form a small tube. In this tube a small rod of radioactive antimony (Sb^{124}) (approximately 2 mm long, diameter 1 mm, weight 10 mg) was inserted and fixed by pinching the aluminium edges of the tube.

Sb^{124} was used for some special reasons. In the first place the half life of this material is 60 days. So its radioactivity was lost after not to long a period. Our experiments had a duration of some months and we thought it better that the activity of the material vanished soon after that. As some banded animals escaped it was not possible to remove all bands at the end of the experiments. But now the escaped animals were not exposed to the radiation for a long time and the 'radio active' material was not scattered over the country. Moreover experiments in the next season could not be spoiled by the remained activity from earlier investigations. In the second place Sb^{124} produces γ-radiation, ranging from 0·12 to 1·7 MV, with a large quantity of the short wavelengths (up to 39% of the 1·7 MV rays). These hard rays penetrated sufficiently through the limestone, the animals were detectable even when hiding at a considerable distance in crooked fissures.

The rods of antimony were made by us and afterwards activated in the cyclotron at Kjeller, Norway, by the mediation of Philips-Roxane N. V., Holland, which firm also estimated the activity to be about 250 μc per rod of 10 mg. No bands were used till three weeks after the process of activation was finished, the material having lost in this time most of the β-radiation caused by equally formed Sb^{122} (half life: 2·8 days).

As far as we know, no damage was done to the animals. At the end of our experiments the bats were as normal as they could be. This was as we expected for by a very rough calculation the dose of radiation was estimated to be 16 r/week in the beginning of the experiments (clinical dose in man: 20 r/week). The radioactive bats were traced by means of a portable battery monitor, provided with a low voltage halogen quenched gamma-counter tube, Philips No. 18502. The monitor was built according to GODFREY[9], with some modifications of minor importance. The Geiger-Müller tube was housed in an aluminium cylinder (Philips Probe PW 4101) which was attached to the end of a bamboo rod, which

[1] From the Laboratory of comparative Physiology University of Amsterdam.

[2] L. BELS, Publicaties van het Natuurhist. Genootschap in Limburg *V* (1952); Thesis, Utrecht.

[3] J. W. SLUITER, P. F. VAN HEERDT, and J. TH. DE SMIDT (review of literature), *De Levende Natuur*, Linders, Arnhem (1956).

[4] J. DE WILDE and P. J. VAN NIEUWENHOVEN, Publicaties van het Natuurhist. Genootschap in Limburg *VII*, 51 (1954).

[5] G. E. FOLK, J. Mammal. *21*, 306 (1940).

[6] F. ANCIAUX DE FAVEAUX, J. Mammal. *16*, 148 (1952).

[7] J. VERSCHUREN, Bull. Mus. Hist. nat. Belg. *25*, 1 (1949).

[8] K. KOWALSKI and R. J. WOJTUSIAK, Cracova Bull. *3*, 33 (1952).

[9] G. K. GODFREY, Ecology *35*, 5 (1954).

could be shoved out to a lenght of 5 m in order to survey fissures in the ceiling of high galleries. For audible detection of counts earphones were connected to the instrument.

Results.— In the winter of 1954–1955 bats were banded with radioactive material in the cave 'Apostelhoeve' near Maastricht. As most of the bats hibernating there were subjected to observations concerning the periodical awakening (*cf.* de Wilde and van Nieuwenhoven[4]), only a small number of animals was available for our purpose. So bats were gathered in another abode, the Riesenberg cave, and after being banded liberated in the 'Apostelhoeve'. This took place with 27 animals on January 6th 1955 at 10·30 p.m. The next day 25 out of these 27 bats were recovered, all asleep again. Only 17 out of this number were equally found by experienced bat-finders which demonstrates the rather high percentage of invisible or overlooked bats. This was the more striking as the galleries in this cave are very low-pitched and therefore could easely be surveyed. Indeed radioactivity transpired from very small fissures and it was amazing to find that actually bats were hiding there. On January 7th another 15 bats were collected, banded and released in the 'Apostelhoeve'-cave and from that date on the whole cave was surveyed with the monitor at regular intervals of time. In Table I the results of these investigations are summarized and compared with the counting of bats which had not been marked with Sb^{124}.

Table I

Recoveries of bats in the 'Apostelhoeve'-cave, Winter 1955

	with radioactive bands %	with normal bands %	without bands
Number on January 7th . .	42 = 100	26 = 100	0
After 1 week	32 76		
After 4 weeks.	27 = 64	6 = 23	10
After 7 weeks.	18 = 43	4 = 15	6
After 10 weeks.	15 = 35	2 = 8	5

It turned out that, using the radioactive tracing method, the number of bats which could be recovered after the indicated intervals of time was much higher than in the conservative way of bat banding. It is obvious that there are two reasons for this discrepancy. In the first place the bats were detected even when invisible, and secondly no handling was needed to decide whether the found animal was a recently banded one or not. From these results may be concluded that an invisible bat reservoir exists even in a cave which is well surveyable. On the other hand the gradually decreasing number of radioactive bats points to the fact that local migration occurs in the second half of the winter.

In Table II the results are classified as to species and sex of the animals under investigation. In the second space the number of bats is shown, in the third one the animals which were still present on March 17th, when the experiment was finished and the bands were removed.

One thing was unsatisfactory in this experiment. We had collected our bats from a cave at some distance from the 'Apostelhoeve'. And as we know bats to have a high fidelity to their winter abodes, local migration could have been favoured by this factor. We found indeed by a superficial survey of the large cave Riesenberg (7 km east of 'Apostelhoeve') two animals (*Myotis daubentoni* ♀, *M. dasycneme* ♂) which had returned to their original hibernating cave (February 24th).

Table II

Species and sex of radioactive banded bats in the 'Apostelhoeve' cave

		Freed on January 6th and 7th	Recovered on March 17th
Myotis daubentoni	♂♀♂♀♂♀♂♀♂♀♂	4	3
		5	2
Myotis mystacinus		9	5
		5	2
Myotis emarginatus . . .		1	1
Myotis nattereri		4	
Myotis dasycneme		4	–
		3	1
Plecotus auritus		5	1
Barbastella barbastellus . .		2	–

In the next season the experiment was repeated. This time in the Flessenberg cave, in the vicinity of Valkenburg. This cave resembles the 'Apostelhoeve'-cave very much, being of the same stretch, with low-pitched galleries and a short sloping tunnel forming the entrance.

Table III

Recoveries of radioactive banded bats in the 'Flessenberg' cave, Winter 1956

Date	Traced bats	Invisible	Movements since previous survey	In entrance area	Not banded
January 13th .	24	0	–	12	–
January 14th .	15	3	–	5	0
January 25th .	13	4	8	9	9
February 10th .	13	5	4	10	6
February 29th .	13(14?)	2(3?)	9	8	5
March 14th .	13	3	1	8	6
March 29th .	9	4	3	7	11

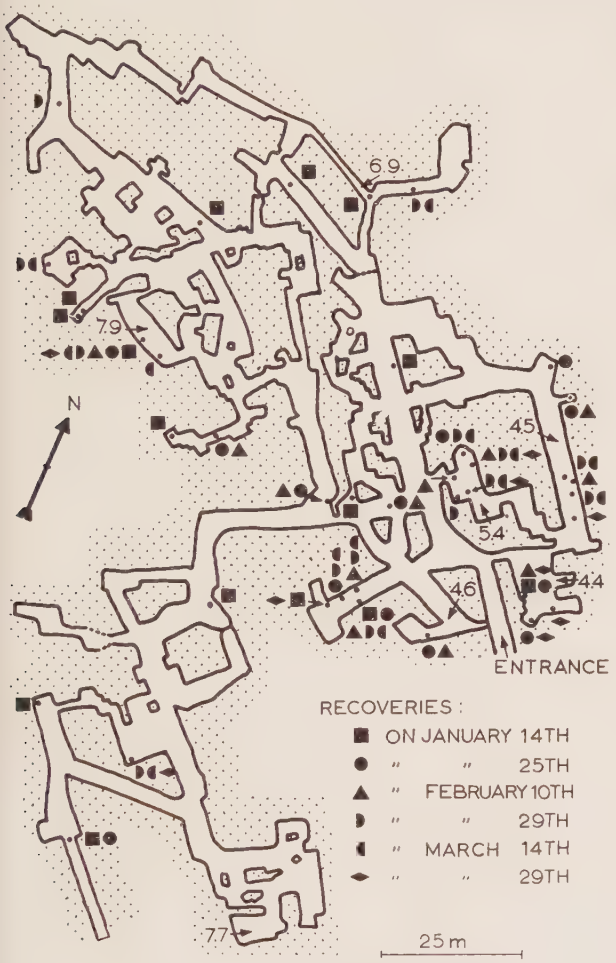
The cave has two parts, the back-part being only accessable by a small passage. This part was much warmer than the entrance area. In Figure the temperatures on March 29th are indicated. On January 13th 1956 all bats which could be collected in the Flessenberg by 5 experienced bat-finders were weighed and banded within the cave and released at a central spot at 17·30 p.m. These bats, to the number of 24, are represented in Table IV.

Table IV

Species and sex of the radioactive banded bats in the 'Flessenberg' cave

		Freed on January 13th	Recovered on March 29th
Myotis daubentoni	♂♀♂♀♂♀♂♀♂♀♂♀♂	2	0
Myotis mystacinus		3	2
		4	3
Myotis emarginatus		1	0
		1	1
Myotis nattereri		1	1
		1	0
Myotis dasycneme		4	1
		1	1
Plecotus auritus		1	0
Rhinolophus hipposideros .		2	0
		3	0

The next day the cave was thoroughly surveyed and this was repeated at intervals of two weeks till March 29th. Then the remaining animals were collected and weighed after removing the bands. The loss of weight over this lapse of time will be discussed elsewhere [VAN NIEUWENHOVEN, thesis (Amsterdam 1956), in the press]. In Table III the results of these periodical surveys are shown. In the second space of this table we find the number of bats, refound on the indicated date. The striking decrease in number, one day after banding, demonstrates the alarming influence of handling the animals: 9 out of 24 had disappeared (the weather was fine, temperature slightly above zero point).



Plan of the Flessenberg-cave.

During the winter, which was very severe, the number of recoveries remained rather constant. Still there was evidence that local migration had not stopped, and at any rate considerable movements took place within the cave (4th space of Table III).

In the Figure we have tried to summarize these movements. The places where radioactive bats were found at the different data are marked by a different sign. Only 1 animal was found at the same spot during the whole period of observation (11 weeks) (*M. emarginatus*), 1 bat remained at the same place during 9 weeks, 1 during 7 weeks and so on.

Local migration had occurred too, as was concluded from the following facts. On February 29th a very high radiation intensity was measured at one place near a fissure, probably caused by two animals, hiding close together. This would bring the total number on that date on 14, one more than in the previous search. Another evidence was, that from January 25th till February 29th we could only trace one specimen of *Rhinolophus hipposideros*. On March 14th there were two. One of them must have returned in the cave after being absent for 6 weeks. It is quite impossible that this radioactive banded bat had been overlooked till then, these animals hanging always absolutely free and the radiation being perceptible at considerable distance (about 10 m).

The third space of Table III gives the number of quite invisible bats and it is obvious, that without radioactive banding the number of recoveries would have been much smaller. In Table III the distribution of radioactive bats in the cave is also shown. When captured, they were equally devided over both parts of the Flessenberg-cave, but later on they concentrated more in the entrance area, which phenomenon was equally found in the 'Apostelhoeve'-cave and which will be studied in detail by one of us (VAN NIEUWENHOVEN).

Homing Experiments.—As beforementioned an accidental homing experiment was performed in the winter of 1955, when two bats were recovered in their original hibernating abode, after being displaced to the 'Apostelhoeve'-cave, where they were released. Early in 1956 (January 12th) we performed a real homing experiment by catching 26 bats in three caves on the east side of the valley of the river Maas (Cave 'Hotsboom', 9 bats; 'Wijngaardsberg', 10 bats; 'Riesenberg', 7 bats), and transporting them to a small cave ('Schark') on the east side of the Jeker-valley. This cave was at a distance of 6 km from the place of origin of the bats and was separated from it by the St. Pietersberg (120 m), the river Maas and the broad Maas-valley. The animals were collected, banded with radioactive bands and released on the same day at 20·00 p.m. The weather was clear, temperature 6°C, wind moderate, SW. The next day the radioactive search of the cave of liberation and of the caves of origin started. These surveys were repeated regularly.

In the rather small cave in which they had been released 9 out of 26 bats remained hibernating, at least for two weeks. Afterwards this number decreased to 5 in 2 months whereupon the experiment was stopped by removing the bands. From 17 animals which disappeared 8 could be recovered, 6 in the original cave where they bad been found hibernating on January 12th, 2 (*Plecotus auritus*) in a small cave about 300 m to the North of the 'Hotsboom'-cave, from where they originated. The first bat which returned was a specimen of *Barbastella barbastellus*, which was found asleep on January 13th in exactly the same place where it had been captured the previous day. As this cave (the Wijngaardsberg) is an extremely small one we are sure, that no other bats had returned at that moment. The next one was found in this cave on January 24th, at a date, that the number of bats which had remained in the cave of liberation (Schark) had not yet decreased. So this bat must have stayed somewhere else between January 12th and January 24th, to return eventually in its original hibernating abode. The same can be said from the first animal, which was recovered in the Hotsboom cave on January 24th. A third radioactive bat was recovered in the Wijngaardsberg in February 9th. In the Riesenberg, one animal had returned on January 14th, the second was found February 29th. But as this cave is a very large one, and the animal was found in a very dangerous part, which was not visited every time, we are not sure, that it did not return before that date.

Summarizing we can report that the following bats returned exactly to the place of origin: *Barbastella barbastellus* 1, *Myotis dasycneme* 3 (out of 5), *M. mystacinus* 1 (out of 10), *M. nattereri* 1.

This work was made possible by a grant from the Netherlands Organisation for Pure Research (Z.W.O.) for which we are deeply appreciative. We also wish to acknowledge our thanks to the biological students from the University of Amsterdam for their assistance and interest.

Zusammenfassung

Winterschlafende Fledermäuse wurden mit Ringen markiert, die radioaktives Antimonium (^{124}Sb) enthielten.

Dadurch konnte gezeigt werden, dass in unzugänglichen Felsspalten ein unsichtbares „Fledermausreservoir" vorhanden ist. Ferner wurde gezeigt, dass im Verlaufe des Winters Wechsel von Höhle zu Höhle stattfinden.

Im Januar 1956 wurden in einer Höhle 26 Fledermäuse gefangen, mit radioaktiven Ringen markiert und in einer 6 km entfernten Höhle ausgesetzt. Nach einem Tag konnte in der Ausgangshöhle der erste Rückkehrer festgestellt werden und kurz hernach 7 weitere Tiere.

3ème Journée Suisse de Microscopie Électronique et 9ème Séance annuelle du Comité Suisse d'Optique

Institut de Physique de l'Université de Genève, le 29 juin 1956.

Comptes rendus des communications

Einige Bemerkungen zur technischen Situation der Elektronenmikroskopie

Es werden die Forderungen abgeschätzt, welche an ein Routine-Elektronenmikroskop gestellt werden, insbesondere von Seite der Hauptanwendungsgebiete Histologie und Metallurgie. An Hand von Schnittaufnahmen von Mitochondrien wird gezeigt, dass das Elektronenmikroskop mit kalter Kathode und elektrostatischem Objektiv diese Forderungen erfüllen kann.

L. Wegmann

Trüb Täuber & Cie., Zürich.

Erfahrungen mit einer kompensierten Aufhängung der kalten Kathode des Trüb-Täuber-Elektronenmikroskops

Das ältere Modell des TTC-EM hat eine horizontal angeordnete kalte Kathode. Auf dem Hochspannungsisolator sitzt ein Aluminiumzwischenstück als Halter für den Kathodenzylinder aus Chromstahl. Die Kathode ist konzentrisch vom Anodenzylinder umgeben. Während des Betriebes erwärmt sich die Kathode und dehnt sich quer zur Strahlrichtung aus. Dadurch wandert der Kathodenkrater in bezug auf die Anodenblende vor- und rückwärts. Der Halter der Kathode wurde so umgebaut, dass sich die Wärmeausdehnung des Halters und der Kathode kompensieren. Der Hochspannungsisolator trägt einen Zylinder aus Invar, über welchen der Aluminiumhalter geschoben ist. Die beiden Teile sind so verschraubt, dass sich an der Stelle des Strahlaustrittes die Längenausdehnung des Invarkernes, des Aluminiumzwischenstückes und der darübergeschobenen Chromstahlkathode aufhebt.

H. Studer

Laboratorium für Elektronenmikroskopie der Universität Bern.

Elektronenmikroskopische Verfolgung der Texturänderung bei der Kaltbearbeitung und Rekristallisation von Kupferdrähten

Die Oberfläche von elektrolytisch polierten und anschliessend geätzten Kupferkristallen zeigt unter dem Elektronenmikroskop eine orientierte Lamellenstruktur. Nach schwacher Kaltbearbeitung erscheinen die Lamellen insbesondere in der Nähe der Kristallitgrenzen verbogen, nach stärkerer tritt eine neue Oberflächenstruktur auf. Stark abgezogene Drähte aus Reinstkupfer rekristallisieren schon bei 100°. Die Keime der neuen Kristalle erscheinen zum Teil als kleine orientierte Würfelchen ($\sim 1\ \mu$). Bei 225° sind die Keime grösser und unregelmässig.

W. Feitknecht und E. Freudiger

Institut für anorganische Chemie der Universität Bern.

Zur Morphologie des Fangos von Acquarossa

Die eisenhaltige Mineralquelle von Acquarossa (Tessin) liefert einen roten Fango, welcher für Heilpackungen verwendet wird. Im Elektronenmikroskop findet man meist spiralig gewundene faden- und bänderförmige Ausscheidungen. Präparate, welche nach dem Kohlehüllenverfahren hergestellt wurden, zeigen, dass die Bündel aus Primärfäden von ungefähr 0,2 μ Durchmesser aufgebaut sind. Diese Grösse entspricht der Dicke von fadenförmigen Mikroorganismen, welche im jungen Fango gefunden werden. Röntgenographische Aufnahmen eines «jungen Fangos» zeigen neben einer einzigen Linie, welche auf β-FeOOH schliessen lässt, nur Linien von Kalziumkarbonat. Der gealterte Fango zeigt die Reflexe von Hydrogoethit. Unter Luftabschluss wird der Fango dunkel bis schwarz. Das schwarze Material besteht aus Eisensulfid, welches offenbar durch die verwesenden Mikroorganismen mit dem im Wasser enthaltenen Sulfat durch Reduktion gebildet werden kann.

H. Studer

Laboratorium für Elektronenmikroskopie der Universität Bern.

Contribution de la microscopie électronique à l'étude de foies normaux ou soumis à des influences variées

Etude de foies: 1° de rats normaux ou sacrifiés de cours de diverses expériences: jeûne, réalimentation, hépatectomies partielles, intoxication au CCl_4; 2° de rats nourris avec des régimes cancérigènes, 3° d'hépatomes humains, en étudiant notamment le gonflement réversible (tuméfaction trouble), la dégénérescence et la régénération des mitochondries, l'ultrastructure des petits corpuscules (microbodies) et leurs rapports avec les mitochondries, les modifications et la régénération de l'ergastoplasme, l'appareil de Golgi et les modifications du nucléole.

C. Rouiller

Laboratoire de Médecine Expérimentale du Collège de France et Institut de Recherches sur le Cancer Gustave Roussy (Villejuif).

Zur Struktur des Peritoneal-Mesothels

Die Mesothelzellen ruhen auf einer Basalmembran von etwa 1000 Å Dicke. Die Zelloberfläche trägt Mikro-Villi (2,5 μ lang, 0,1 μ breit), deren Enden oft köpfchenförmig erweitert sind. Die freie Zellmembran, die auch die Fortsätze überzieht, besteht aus zwei dichteren Schichten, die durch eine solche geringerer Dichte getrennt sind. Einige der Bläschen, die im Zytoplasma verteilt sind,

scheinen sich gegen die Zelloberfläche hin zu öffnen, andere basiswärts. Längliche und rundliche Mitochondrienprofile liegen besonders in der Mittelschicht des Mesothels. Sie zeigen die übliche Innenstruktur. Die seitlichen Zellmembranen verlaufen schief zur Oberfläche. Sie sind apikal verstärkt und basal von gewundenem, schwer verfolgbarem Verlauf.

A. Vogel

Histopathologisches Institut der Universität und Laboratorium für Elektronenmikroskopie der Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich.

Einige Ergebnisse über die Chondriosomen- und Plastidenstruktur bei Zea Mais

Die Chondriosomen und Plastiden embryonaler Wurzelellen lassen sich durch ihre Struktur unterscheiden. Erstere zeigen auf mehr oder weniger homogenem, wenig dichtem Grunde Quer- und Längsschnitte durch gewundene Röhrchen. Die Plastiden besitzen eine viel dichtere, körnelig-fädige Struktur. In dieser sind hellere, runde, deutlich umrandete Scheiben (bzw. Kugeln) und, in geringerer Zahl, dunkle nicht umrandete Scheiben (oder Kugeln) zu erkennen. Beide Zellorganellen sind von einer dichten Membran umgeben. Die Struktur der Plastiden in Vegetationspunktnähe aus jüngsten Blättern keimender Pflänzchen ist ebenfalls bemerkenswert. Ausser den riesigen Stärkekörnern findet man wenige «Grana», die nur 1–3 Lamellen besitzen. Diese sind durch verhältnismässig weite Zwischenräume getrennt. Die Stärkekörner sind häufig von einer mehr oder weniger regelmässig gegliederten «Kette» umgeben.

E. Heitz

Max-Planck-Institut für Biologie, Tübingen, et Laboratoire de Biophysique de l'Université de Genève.

Ultrastructure des gamètes d'Allomyces macrogynus

L'ultrastructure de ce champignon phycomycète révèle: des mitochondries concentrées à la périphérie du corps paranucléaire basophile (RNA), dont la lamellation interne rappelle celle des mitochondries animales; un corps paranucléaire, dont la matière constitutive, plus dense que celle du noyau, est d'aspect granulaire et dépourvue de constituant membraneux; un cytoplasme périphérique non basophile, exempt de constituant granulaire et semblant contenir des formations membraneuses; une membrane nucléaire, formée d'une structure double percée de pores.

G. Turian et E. Kellenberger

Institut de Botanique et Laboratoire de Biophysique de l'Université de Genève.

Fibrilles pédonculaires et structures myoïdes chez quelques ciliés

La partie élastique du fixateur des ciliés péritriches est principalement constituée par un faisceau fibreux dont les éléments sont en continuité avec les cils de la scopula et formés par l'accroissement des constituants ciliaires, par celui de la membrane chez *Campanella*, par celui des fibrilles chez *Opercularia* et *Zoothamnium*. Chez *Chilodocona* (Chonotriche) les fibrilles pédonculaires sont secrétées par des glandules cytoplasmiques. Les myoïdes ectoplasmiques (ex.: myonèmes de Stentor) ont une structure complexe régulièrement ordonnée sous forme d'un ensemble de minces feuillets parallèles. Les myoïdes endoplasmiques (ex.: rétracteur du disque chez *Opercularia*, spasmonème de *Vorticella*) ont une structure irrégulièrement trabéculaire.

C. Rouiller

Laboratoire de médecine expérimentale du Collège de France, Paris.

Etude de la fixation du noyau bactérien

Voir Exper. *12*, 420 (1956).

A. Ryter et E. Kellenberger

Laboratoire de Biophysique de l'Université de Genève.

Méthode de comptage de particules à l'aide du microscope électronique

La filtration sur agar[1] est une méthode de préparation en microscopie électronique qui n'est pas sélective, qui évite l'enrichissement en sels et qui ne montre que relativement peu d'artefacts. Pour ces raisons, elle se prête à la détermination de la concentration de particules en suspension. On mélange la solution à titrer avec un nombre défini de sphères de Latex de polystyrène. On détermine par comptage sur 5 à 10 micrographies, le rapport numérique entre Latex et particules. L'erreur de cette méthode de comptage est inférieure à 20% ce qui permet son emploi dans des problèmes quantitatifs.

W. Arber et G. Kellenberger

Laboratoire de Biophysique de l'Université de Genève

Examen de lysats de bactéries lysogènes déficientes

Six souches lysogènes déficientes de *Escherichia coli* K12 (λ) on été examinées au microscope électronique, après induction par les UV. L'analyse quantitative du lysat ne révèle pas de phages morphologiquement complets, mais 30 à 300 «doughnuts» (membranes vides de têtes de phages) par bactérie lysée. Quatre souches produisent également 30 à 300 queues de phages par bactérie lysée; ces queues ne sont pas attachées aux membranes de têtes. Les dimensions de ces structures correspondent à celles du bactériophage (λ) qui n'est libéré qu'exceptionnellement sous sa forme infectieuse par une sur 10^3 à 10^7 bactéries induites.

W. Arber et E. Kellenberger

Laboratoire de Biophysique de l'Université de Genève.

Les filaments capsulaires de Escherichia coli et leurs manifestations biologiques

Les filaments capsulaires sont des appendices provenant de la surface bactérienne qui se distinguent des flagelles, car ils sont très fragiles, très droits, nombreux et très minces (diamètre 100 Å). Les bactéries peuvent se trouver sous deux formes, l'une filamentée, l'autre entièrement dépourvue de filaments, et peuvent passer spontanément de l'une à l'autre avec un taux d'environ 10^{-3} par génération. Les formes filamentées forment des colonies lisses sur agar, agglutinent les globules rouges et leur mobilité électrophorétique est inférieure à celle de la souche «rough».

C. Brinton

Laboratoire de Biophysique de l'Université de Genève.

[1] E. et G. Kellenberger, Int. Conf. on E. M. London, 1954. – E. Kellenberger et W. Arber, Virology (sous presse).

Oberflächenabdrucke in der Biologie

Zur Ergänzung der Schnittmethode wird für die Untersuchung pflanzlicher Objekte, wie zum Beispiel Holz, Pollenkörner, Blattoberflächen, mit gutem Erfolg die von Bradley entwickelte Kohle-Aufdampfmethode verwendet. Die Präparationstechnik wird beschrieben.

K. Mühlethaler

Institut für Allgemeine Botanik und Laboratorium für Elektronenmikroskopie der Eidgenössischen Technischen Hochschule, Zürich.

Eine neue Methode zur Herstellung von Formvarfolien

Nach Schaefer und Harker[2] werden die Formvarfolien auf Glas gegossen und nach dem Trocknen auf eine Wasseroberfläche abgezogen. Durch Verwendung geeigneter Lösungsmittel gelingt es, die Formvarfolien durch Spreiten auf Wasser herzustellen. Es wird eine Lösung von 0,8 bis 0,9% in Epichlorhydrin verwendet, welcher 1 Tropfen Butylalkohol/cm³ beigesetzt ist. Damit der Film völlig frei von Blasen wird, kann dem Wasser ein wenig Netzmittel zugegeben werden (zum Beispiel «Teepol»). Zur Herstellung des Filmes wird 1 Tropfen der Formvarlösung aus geringer Höhe auf die Wasseroberfläche getropft.

H. Studer

Laboratorium für Elektronenmikroskopie der Universität Bern.

Inclusion au polyester

Voir Exper. *12*, 421 (1956).

A. Ryter, W. Schwab et E. Kellenberger

Laboratoire Vinox et Laboratoire de Biophysique de l'Université de Genève.

Présentation d'un ultramicrotome à avance mécanique

Voir Exper. *12*, 282 (1956).

E. Kellenberger

Laboratoire de Biophysique de l'Université de Genève.

Premières expériences à l'ultramicrotome Cook and Perkins

Cet appareil satisfait aux critères de rendement et de régularité qu'on exige d'un ultramicrotome moderne. La coupe avec moteur est facile à contrôler et permet l'obtention régulière de rubans de coupes homogènement blanches. L'équilibre du porte-objet, la souplesse du mouvement, et le déplacement fin du couteau dans les deux directions horizontales sont particulièrement réussis.

A. Gautier

Centre de Microscopie Electronique dc l'Université de Lausanne.

[2] Schaefer und Harker, J. appl. Phys. *13*, 427 (1942).

Congressus

SUISSE

Symposium international pour l'étude des rapports entre les hôtes vertébrés et leurs parasites (Insectes et Vers)

Un symposium consacré à la spécificité parasitaire et à l'évolution parallèle des Insectes et Helminthes parasites de Vertébrés, sous la présidence du Dr. Ernst Mayr (Harvard), aura lieu à Neuchâtel (Suisse) du 15–18 avril 1957.

Le but est de réunir à la fois des parasitologistes et des spécialistes des groupes d'hôtes afin de discuter les différents problèmes qui ont été groupés tentativement sous les titres suivants: Adaptation, Dispersion, Spéciation et Phylogénie.

Les personnes suivantes ont accepté de présenter des rapports ou de prendre part aux discussions: *Hôtes.* Harrison-Mathews (London), Kuhn-Schneider (Zurich), Marshall (London), B. Patterson (Harvard), Stresemann (Berlin). *Parasites.* Baer (Neuchâtel), Chabaud (Paris), Clay (London), Dubois (Neuchâtel), Euzet (Montpellier), Hopkins (Tring), Kent (Baltimore), Llewellyn (Birmingham), Manter (Lincoln, Neb.), Theodor (Jerusalem).

Il est prévu que tous les rapports seront soit multigraphiés soit imprimés avant la réunion ceci afin d'éviter les traductions et de gagner du temps en vue des discussions.

Le symposium se tiendra sous les auspices de U.I.S.B. et de l'Université de Neuchâtel. Pour tous renseignements complémentaires, s'adresser au secrétaire général, Prof. Jean G. Baer, C.P.2, Neuchâtel, 7 (Suisse).

Corrigendum

J. L. Gellerman and H. Schlenk: *Quantitative Paper Chromatography of Lipids*, Exper. *12*, fasc. 9, 342 (1956).

Communication of the authors: On page 343, left column, line 25 from top, the text should read: '... chloroform-methanol-water solvent mixture (25:75:5 by volume)' instead of '... chloroform-methanol solvent mixture (3:1 by volume)'.

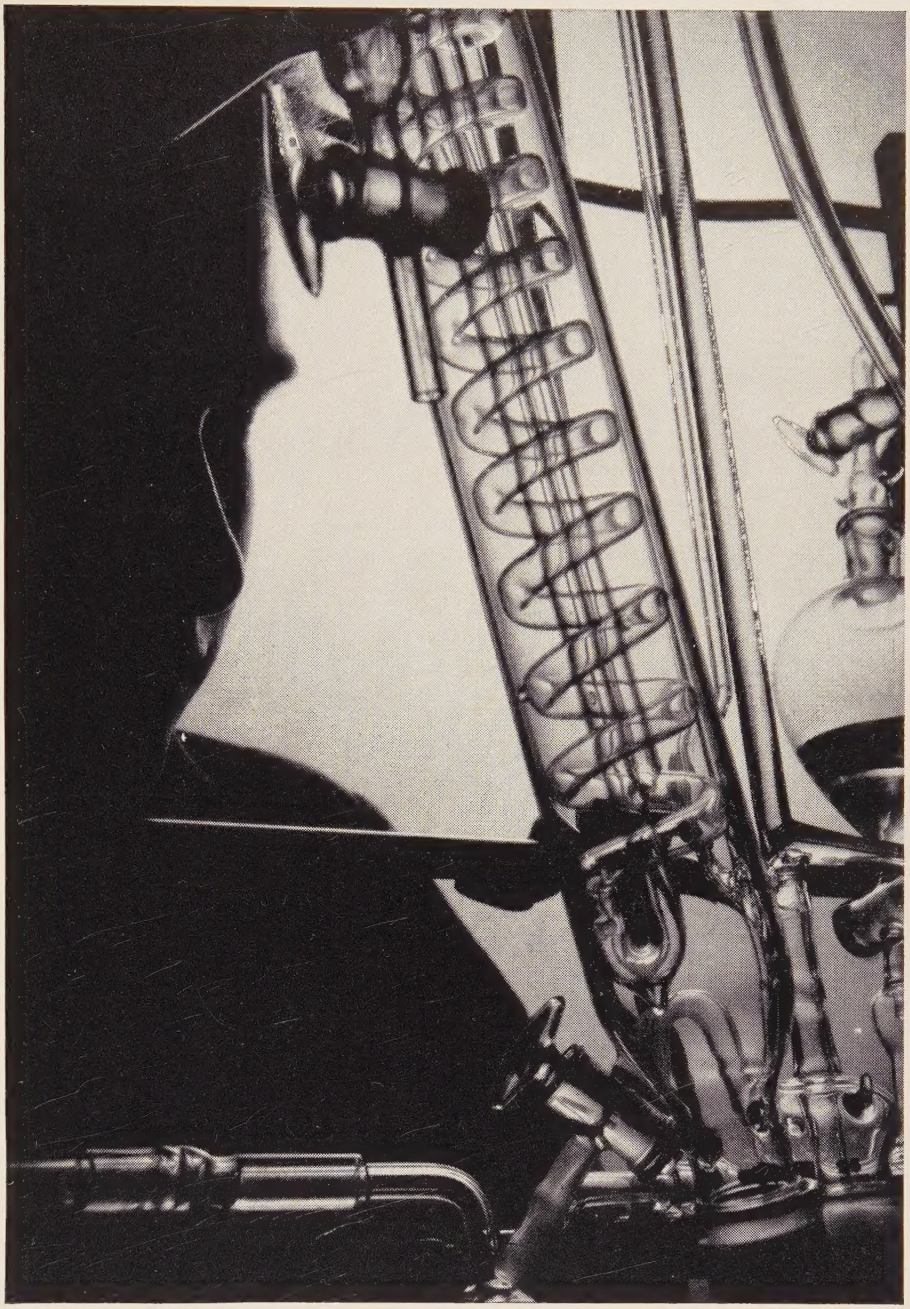
Corrigendum

In the advertisement appearing in the November issue XII/11, 1956 of Experientia:

'The Journal of Insect Physiology' was described as 'Edited by V. G. Dethier, Baltimore; Editors: H. E. Hinton, Bristol; M. Lüscher, Bern.'

This was an error and should have read 'Editors: V. G. Dethier, Baltimore; H. E. Hinton, Bristol; M. Lüscher, Bern'.

Pergamon Press Ltd., London, New York.



S A N D O Z - Präparate

basieren auf eigenen chemischen

und pharmakologischen Forschungen

sowie weltweiter klinischer

Erfahrung.

SANDOZ

UNIVERSITAS

A German Review of Arts and Sciences Quarterly
English Language Edition

Editor: Dr. H. Walter Bähr
Editorial Board: H. W. Bähr and H. Rotta

Contents of number 2:

Dr. Albert Schweitzer, Nobel prize winner, Lambarené
The Problem of Ethics and the Development of Human Thought

Prof. Walther Gerlach, University of Munich
The Hazards of Radiation and its Danger to Life

Wieland Wagner, Bayreuth
Richard Wagner's Operas Today – The New Bayreuth Style

Prof. Wilhelm Röpke, University of Geneva
This Age of Inflation

Prof. Will Grohmann, Institute of Fine Arts, Berlin
The Special Case of Paul Klee

Prof. Hans Kienle, University of Heidelberg
The Technical Exploitation of Solar Energy

Prof. Max Wundt, University of Tübingen
Kant: The Changing Picture

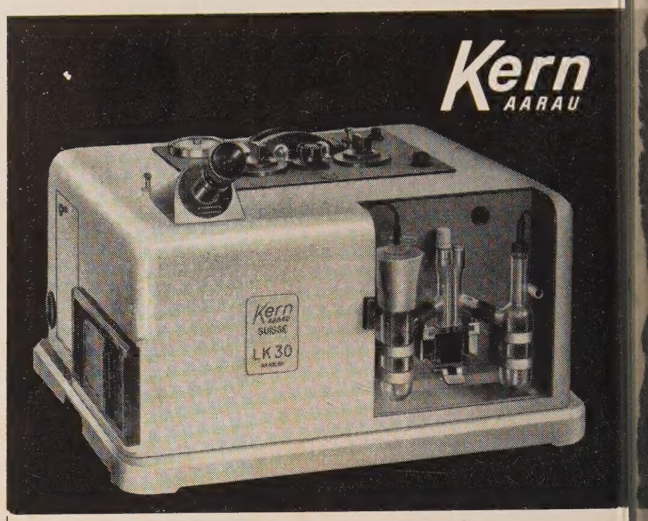
Prof. Werner Heisenberg, Nobel prize winner, University of Göttingen
Atomic Research and the Causality of Nature

Prof. Julius Büdel, University of Würzburg
The Ice Age in the Tropics

Prof. Richard Kuhn, Nobel prize winner, University of Heidelberg
Intestinal Bacteria and Nutrition

Universitas appears quarterly. Each issue contains 112 pages with 10–12 essays. Annual subscription: $ 4/00/– £ 1/8/7 – Rs 19/–/– excluding postage. Single copies: $ 1/10/– £ –/7/10 – Rs 5/4/– excluding postage

Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.
P. O. Box 40 / Stuttgart / Germany



Mikro-Elektrophorese-apparat Kern, Modell LK 30

Interferometrische Registrierung des Konzentrationsverlaufs, zuverlässige, einfache Arbeitsweise und Auswertung.

Jetzt auch mit Simultanzelle zur gleichzeitigen Durchführung zweier Analysen.

Verlangen Sie Prospekte Med. 558 und Med. 564

Kern & Co. AG. Aarau gegr. 1819

EXPERIENTIA *Sammelmappe*

Diese Mappe hat den Zweck, die Hefte des laufenden Jahrganges zusammenzuhalten, bevor der komplette Jahrgang gebunden werden kann. Die einzelnen Hefte können mittels einer neuartigen patentierten Haltevorrichtung in die Mappe eingeheftet und im Bedarfsfall wieder herausgelöst werden. Mit dieser geschmackvoll in Kunstleder gebundenen Mappe soll dem Übelstand abgeholfen werden, dass einzelne Hefte im Laufe des Jahres verlorengehen und vor dem Einbinden nachbezogen werden müssen. Die Sammelmappe ist so massiv konstruiert, daß sie ihren Dienst auf Jahre hinaus leisten wird.

Preis in Kunstleder gebunden: Fr. 6.75

— — — — — — — — — — — — —

BESTELLSCHEIN

An den Birkhäuser Verlag, Basel 10 (Schweiz)
Ich bestelle... Sammelmappe(n) zum Preise von Fr. 6.75

Name: Vorname:

Ort: Strasse:

Bitte in Blockschrift schreiben